



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología

**“Estudio funcional de genes de densidad poblacional  
(*luxR/luxI*) y de dominios fotorreceptores sospechados como  
reguladores de respuesta de virulencia en *Acinetobacter*”**

Trabajo de Tesis Doctoral

Bioq. Mariana Bitrian

Directora: Dra. Clara B. Nudel

Codirector: Dr. Rodrigo H. González

2013

## Agradecimientos

A mi directora, Dra. Clara Nudel, por haberme permitido ser parte de un excelente grupo de trabajo, por su apoyo constante y confianza en mi trabajo.

A mi codirector, Dr. Rodrigo González, por enseñarme que en la investigación, como en la vida, siempre hay que tener un “plan B”.

Al Dr. Klaas Hellingwerf, por haberme permitido trabajar en su laboratorio en la Universidad de Amsterdam, lo cual me brindó herramientas fundamentales para mi formación. Gracias por el apoyo y participación activa en el desarrollo de esta Tesis, y por contagiarme ese espíritu científico.

Al Dr. Michael van der Horst, que con su personalidad alocada y divertida me ayudó a dar mis primeros pasos en el mundo de la investigación.

Al Dr. Gastón Paris, por su colaboración y muy buena predisposición. Gracias por permitirme conocer tu grupo de trabajo en la Fundación Instituto Leloir, donde siempre me sentí bienvenida.

Al Dr. Osvaldo Cascone y a la Dra. Ana María Giulietti por su apoyo permanente.

A mis compañeros de grupo: Marie, Clau, Ale N, Mauro, Hernán y Tomás, que hicieron que cada día tuviera una cuota de humor. Gracias por guiarme cuando estaba perdida, por ayudarme siempre, por levantarme cuando me caía y por haber sido un soporte importantísimo y necesario para el desarrollo de este trabajo.

A los integrantes de la Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología: al Dr. Walter Mac Cormack, Dr. Julián Rodríguez Talou, Dra. María Victoria Miranda, Dra. Silvia Camperi y Dra. Susana Vazquez, que siempre me brindaron su ayuda y respondieron a mis inquietudes. A mis compañeros/as y amigos/as María, Ale C., Alex, Caro, Lucía, Carla, Virginia, Cami, Marie M., Laura, Emi, Fer, Silvana, Silvia H., Lucas R., Lucho, Nico, Ariel, Victor, Gus, Fede, Edy, Pancho y Lucas M. A., que me ayudaron frente a las pequeñas y grandes dificultades, que supieron aconsejarme de la mejor manera y que me enseñaron a transformar mis frustraciones en valiosas enseñanzas.

A mis amigas Marie, Clau e Ire, que me escucharon cuando necesite hablar, me alentaron cuando me faltaban fuerzas y me aconsejaron cuando dudé. Gracias por esa locura y alegría infinita.

A mis amigas de la facu, Lele, Lau, Lour, Guille y Cece, que cerca o lejos siguieron y apoyaron cada uno de mis pasos en este trabajo.

A mis amigas (hermanas) de Gesell, Dan, Pau, Noe y Nati que me acompañaron en esta y en cada etapa de mi vida.

A Dan y Marian, dos personas muy especiales en mi vida, que se alegraron, se enojaron y vivieron cada instante de esta tesis a la par mía. Gracias amigos por los consejos y por alentarme cada día.

A mis suegros, Lili y Lito, mis cuñados Aldi, Kari y Marce y mis sobrinas Sol y Brisa, por su constante apoyo y su cariño eterno.

A mi abuela, Iaia, por sus sabias palabras y consejos.

A mi hermano Fer, por estar junto a mí siempre, por protegerme, cuidarme y enseñarme a mirar con otros ojos.

A mis papás, Claudia y Carlos, por alentarme en cada paso de mi vida, por estar al “pie del cañon” para lo que necesite y por enseñarme a mirar siempre para adelante.

A mi amor, Gabriel, por ser el gran compañero de mi vida, por darme su apoyo constante, por su contención en momentos difíciles, por sus preciados consejos, pero sobre todo por llenar de amor y alegría mis días.

**Parte de los resultados de esta tesis doctoral han sido publicados en:**

**Bitrian, M., Solari, C. M., González, R. H., Nudel, C. B. (2012).** Identification of virulence markers in clinically relevant strains of *Acinetobacter* genospecies. *Int Microbiol* **15**, 79-88.

**Bitrian, M., González, R. H., Paris, G. Hellingwerf, K. J., Nudel, C. B.** Blue-light dependent inhibition of twitching motility in *Acinetobacter baylyi* ADP1: Additive involvement of three BLUF domain-containing proteins. Presentado en Journal of Bacteriology en Febrero de 2013.

## Resumen

El género *Acinetobacter* está integrado por bacterias Gram-negativas no fermentativas de la clase *Gammaproteobacteria* y comprende tanto bacterias ambientales como patógenas oportunistas. El complejo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (Acb) ha adquirido gran importancia debido a su persistencia en infecciones intrahospitalarias y su perfil de multirresistencia a los agentes antimicrobianos convencionales. Con la finalidad de proveer nuevas herramientas que puedan emplearse en el tratamiento de la infección, se propone el estudio de marcadores fenotípicos, genes de densidad poblacional (QS), y de dominios fotorreceptores con el objeto de evaluar su relación con la respuesta de virulencia en *Acinetobacter*.

Nueve cepas clínicamente relevantes del género *Acinetobacter* fueron analizadas en cuanto a marcadores fenotípicos relacionados con virulencia. Si bien, ninguna de ellas mostró secreción de proteasas, ni síntesis de acil homoserino lactonas (AHL) de cadena corta, otros marcadores como la secreción de lipasa, la formación de biofilm, la motilidad celular, la resistencia antibiótica y la actividad hemolítica mostraron gran variabilidad. Por otra parte, la producción de sideróforos de tipo catecol fue significativamente mayor en las cepas aisladas de pacientes, por lo que podría ser considerado un marcador de virulencia en *Acinetobacter*. Todos los miembros del complejo Acb produjeron AHL de cadena mediana o larga y presentaron inhibición de la motilidad tipo *twitching* por luz azul. El análisis filogenético de las familias LuxI y LuxR demostró que las proteínas del sistema de QS poseen un origen ancestral dentro de la clase *Gammaproteobacteria* y se reforzó la hipótesis de la adquisición de genes reguladores de QS por transferencia horizontal.

Muchos organismos han desarrollado fotorreceptores capaces de absorber la luz a través de sus cromóforos. Las proteínas BLUF mostraron una distribución predominante en la clase *Gammaproteobacteria* y bacterias quimitróficas, siendo la arquitectura BLUF corta la más frecuente. Mientras *A. baumannii* posee una única secuencia codificante para proteína BLUF, *A. baylyi* ADP1 presenta cuatro secuencias putativas para proteínas BLUF, reflejando la importancia de su conservación.

La formación de biofilm en *A. baylyi* ADP1, a diferencia a lo descrito para *A. baumannii*, no mostró regulación por luz ni temperatura. Además, en *A. baylyi* la luz inhibió la producción de sideróforos de tipo catecol, la frecuencia de transformación y la motilidad tipo *twitching*. El análisis de la participación de las cuatro proteínas BLUF en la inhibición de la motilidad en *A. baylyi* ADP1 se realizó por noqueo de sus genes codificantes y posterior complementación, revelando que las

proteínas codificadas por los genes ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129 son activas y necesarias para la regulación de la motilidad tipo *twitching* y pueden complementarse unas a otras en su función, mientras que ACIAD2110 no participa en la regulación de este fenotipo. Esta conclusión fue también confirmada por el análisis de mutantes noqueadas en múltiples genes (ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129). Los cuatro genes se expresaron tanto en luz como en oscuridad. Sin embargo, los niveles de expresión de ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129 fueron menores bajo la incidencia de luz azul, lo que explica la necesidad de que los tres genes sean expresados para alcanzar la cantidad de fotorreceptor requerida para provocar la inhibición de la motilidad.

Este trabajo de tesis mostró la variabilidad que presentan los miembros del género *Acinetobacter* en cuanto a los marcadores fenotípicos relacionados con virulencia, el sistema de QS y las proteínas BLUF, reflejando la gran dificultad para controlar las infecciones generadas por este patógeno oportunista. La regulación de la motilidad tipo *twitching* mediada por proteínas BLUF en *A. baylyi* ADP1 revela una redundancia genética poco común en bacterias y constituye el primer ejemplo de acción conjunta de tres fotorreceptores en un organismo procarionta.

*"Si buscas resultados distintos, no hagas siempre lo mismo"*

*Albert Einstein*

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS.....  | XI        |
| ÍNDICE DE TABLAS.....   | XIV       |
| ABREVIATURAS.....   | XV        |
| <br>  |           |
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1. Historia, taxonomía y características del género <i>Acinetobacter</i> .....</b> | <b>1</b>  |
| <b>2. Impacto clínico de <i>Acinetobacter</i>.....</b>                                | <b>4</b>  |
| 2.1. Infecciones nosocomiales .....   | 4         |
| 2.2. Infecciones adquiridas en la comunidad .....                                     | 5         |
| 2.3. Infecciones asociadas a desastres naturales.....                                 | 5         |
| <b>3. Patogenicidad y factores de virulencia.....</b>                                 | <b>6</b>  |
| 3.1. Regulación de la formación de biofilm en <i>A. baumannii</i> .....               | 7         |
| 3.1.1. Adherencia a superficies abióticas.....  | 7         |
| 3.1.2. Adherencia a superficies bióticas.....   | 8         |
| 3.2. Adquisición de hierro – Sideróforos.....   | 9         |
| 3.3. Sistemas de densidad poblacional ( <i>Quorum sensing</i> , QS).....              | 11        |
| 3.4. Polisacáridos capsulares.....  | 13        |
| 3.5. Lipopolisacáridos .....  | 14        |
| <b>4. <i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1.....</b>                                       | <b>14</b> |
| 4.1. Origen de <i>A. baylyi</i> ADP1.....   | 14        |
| 4.2. <i>A. baylyi</i> ADP1 como organismo modelo.....                                 | 15        |
| 4.3. Apéndices celulares de <i>A. baylyi</i> ADP1.....                                | 16        |
| 4.3.1. Biofilm en <i>A. baylyi</i> ADP1 .....   | 16        |
| 4.3.2. <i>Twitching motility</i> .....  | 17        |
| <b>5. Aplicaciones ambientales y biotecnológicas de <i>Acinetobacter</i> .....</b>    | <b>18</b> |
| 5.1. Biorremediación de contaminantes .....   | 19        |
| 5.2. Bioproductos.....  | 19        |
| 5.2.1. Bioemulsificantes.....   | 19        |
| 5.2.2. Lipasas .....  | 20        |



|  |               |
|--|---------------|
| 5.2.3. Triacilglicerol y ésteres de cera .....   | 20            |
| <b>6. Fotorreceptores.....</b>   | <b>21</b>     |
| 6.1. Clasificación de fotorreceptores .....  | 22            |
| 6.1.1. Fitocromos.....   | 23            |
| 6.1.2. Rodopsinas.....   | 24            |
| 6.1.3. Xantopsinas.....  | 24            |
| 6.1.4. Criptocromos .....  | 25            |
| 6.1.5. Fototropinas: dominios LOV.....   | 26            |
| 6.1.6. Proteínas BLUF.....   | 27            |
| 6.2. Procesos regulados por luz en bacterias quimiotróficas.....   | 29            |
| <br><b>OBJETIVO GENERAL .....</b>  | <br><b>31</b> |
| <br><b>Capítulo 1: Estudio de marcadores fenotípicos relacionados con virulencia en cepas de importancia clínica del género <i>Acinetobacter</i></b> |               |
| INTRODUCCIÓN .....   | 33            |
| OBJETIVOS.....   | 35            |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 36            |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN   |               |
| 1. Análisis de marcadores fenotípicos relacionados con virulencia.....   | 41            |
| 1.1. Actividad de lipasas y proteasas.....   | 41            |
| 1.2. Formación de biofilm.....   | 42            |
| 1.3. Hemólisis.....  | 42            |
| 1.4. Resistencia a antibióticos.....   | 43            |
| 1.5. Producción de sideróforos de tipo catecol.....  | 44            |
| 1.6. Motilidad en condiciones de luz y oscuridad .....   | 44            |
| 1.7. Producción de autoinductores de QS (AHL) .....  | 46            |
| 2. Búsqueda de genes <i>luxI</i> y <i>luxR</i> .....   | 48            |
| 3. Análisis filogenético de LuxI y LuxR.....   | 49            |
| CONCLUSIONES.....  | 54            |

## Capítulo 2: Distribución y organización de fotorreceptores con dominio BLUF en bacterias en general y en el género *Acinetobacter* en particular

|  |    |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN .....   | 57 |
| OBJETIVOS.....   | 60 |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 61 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN   |    |
| 1. Distribución de proteínas BLUF en bacterias.....  | 62 |
| 1.1. Distribución de proteínas BLUF en filos bacterianos.....  | 62 |
| 1.2. Distribución de proteínas BLUF en bacterias fototróficas y quimiotróficas .....   | 63 |
| 1.2.1. Arquitectura y número de proteínas BLUF en bacterias quimiotróficas .....   | 64 |
| 2. Proteínas BLUF en el género <i>Acinetobacter</i> .....  | 68 |
| 2.1. Alineamiento de las proteínas BLUF de <i>A. baylyi</i> ADP1 .....   | 69 |
| 2.2. Entorno de las proteínas BLUF de <i>A. baylyi</i> ADP1.....   | 70 |
| 2.3. Análisis filogenético de dominios BLUF de <i>A. baylyi</i> ADP1 junto a otros miembros de la clase <i>Gammaproteobacteria</i> ..... | 71 |
| CONCLUSIONES.....  | 75 |

## Capítulo 3: Análisis de proteínas BLUF en *Acinetobacter*: *A. baylyi* ADP1 como organismo modelo

|   |     |
|---|-----|
| INTRODUCCIÓN .....  | 77  |
| OBJETIVOS.....  | 82  |
| MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 83  |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN  |     |
| 1. Estudio de la respuesta a la luz en <i>A. baylyi</i> ADP1 e identificación de posibles fenotipos asociados ..... | 99  |
| 1.1. Crecimiento.....   | 99  |
| 1.2. Formación de biofilm.....  | 100 |
| 1.3. Expresión del gen <i>lipA</i> y síntesis de lipasa .....   | 101 |
| 1.4. Producción de sideróforos de tipo catecol.....   | 102 |
| 1.5. Motilidad tipo <i>Twitching</i> .....  | 103 |
| 1.6. Producción de polisacáridos de ramnosa .....   | 104 |

|  |            |
|--|------------|
| 1.7. Transformabilidad .....   | 105        |
| 2. Evaluación del efecto de factores ambientales en la motilidad tipo <i>twitching</i> .....   | 107        |
| 2.1. Especificidad de la longitud de onda .....  | 107        |
| 2.2. Efecto de la temperatura .....  | 109        |
| 2.3. Efecto del hierro .....   | 110        |
| 3. Obtención de mutantes noqueadas en genes codificantes para proteínas BLUF de <i>A. baylyi</i> ADP1 y su evaluación geno/fenotípica .....                                | 111        |
| 3.1. Construcción de mutantes noqueadas simples en genes codificantes para proteínas BLUF de <i>A. baylyi</i> ADP1 y estudio de la motilidad tipo <i>twitching</i> .....   | 111        |
| 3.2. Construcción de mutantes noqueadas en múltiples genes codificantes para proteínas BLUF de <i>A. baylyi</i> ADP1 y estudio de la motilidad tipo <i>twitching</i> ..... | 112        |
| 4. Complementación de mutantes noqueadas de <i>A. baylyi</i> ADP1 y estudio de la motilidad tipo <i>twitching</i> .....  | 114        |
| 5. Análisis de la expresión de los cuatro genes codificantes para proteínas BLUF de <i>A. baylyi</i> ADP1 bajo condiciones de luz y oscuridad .....                        | 117        |
| CONCLUSIONES.....  | 120        |
| <br>   |            |
| <b>DISCUSIÓN FINAL .....</b>   | <b>122</b> |
| <br>   |            |
| <b>Anexo 1: Secuencias codificantes para LuxI y LuxR en <i>Acinetobacter</i> .....</b>   | <b>124</b> |
| <br>   |            |
| <b>Anexo 2: Expresión heteróloga de proteínas BLUF de <i>A. baylyi</i> ADP1</b>  |            |
| 1. Construcción de plásmidos para la expresión de proteínas BLUF .....   | 133        |
| 2. Expresión de proteínas BLUF en <i>E. coli</i> M15 (pAMB2, pAMB3, pAMB4 o pAMB5).....  | 133        |
| 3. Expresión de proteínas BLUF en <i>E. coli</i> M15 (pAMM1, pAMM2, pAMM3 o pAMM4) .....   | 136        |
| 4. Conclusiones .....  | 138        |
| <br>   |            |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>139</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Esquema de la captación de hierro mediada por sideróforos en bacterias Gram-negativas.....   | 10 |
| <b>Figura 2.</b> Estructura de acil homoserino lactona (AHL) utilizada como autoinductor en el típico sistema de QS de bacterias Gram-negativas.....  | 11 |
| <b>Figura 3.</b> Esquema de la regulación de la bioluminiscencia en <i>V. fischeri</i> por QS.....  | 12 |
| <b>Figura 4.</b> Alineamiento de ORF tipo <i>csu</i> en los genomas de <i>A. baylyi</i> ADP1, <i>A. baumannii</i> 19606 y <i>E. coli</i> .....  | 17 |
| <b>Figura 5.</b> La luz y los fotorreceptores.....  | 22 |
| <b>Figura 6.</b> Estructura del dominio BLUF correspondiente a BlrB de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ....  | 27 |
| <b>Figura 7.</b> Estructura de rayos X del dominio BLUF de AppA de <i>R. sphaeroides</i> .....  | 28 |
| <b>Figura 8.</b> Actividad lipasa en sobrenadantes de cultivo de siete cepas clínicamente relevantes del género <i>Acinetobacter</i> .....  | 41 |
| <b>Figura 9.</b> Formación de biofilm en cepas clínicamente relevantes del género <i>Acinetobacter</i> ....   | 42 |
| <b>Figura 10.</b> Hemólisis producida por <i>A. haemolyticus</i> RUH 0044.....  | 43 |
| <b>Figura 11.</b> Producción de sideróforos de tipo catecol en cepas clínicamente relevantes del género <i>Acinetobacter</i> .....  | 44 |
| <b>Figura 12.</b> Efecto de la luz azul en la motilidad de cepas clínicamente relevantes de <i>Acinetobacter</i> .....  | 46 |
| <b>Figura 13.</b> Detección de AHL en placas RP-TLC.....  | 47 |
| <b>Figura 14.</b> Árbol filogenético de miembros de la familia LuxI de la clase <i>Gammaproteobacteria</i> obtenido por el método de <i>Neighbor-joining</i> .....  | 51 |
| <b>Figura 15.</b> Árbol filogenético de miembros de la familia LuxR de la clase <i>Gammaproteobacteria</i> obtenido por el método de <i>Neighbor-joining</i> . ....   | 52 |
| <b>Figura 16.</b> Árbol filogenético de secuencias 16SARNr de bacterias de la clase <i>Gammaproteobacteria</i> que contienen secuencias codificantes para LuxI y/o LuxR por método de <i>Neighbor-joining</i> ..... | 53 |
| <b>Figura 17.</b> Arquitectura de las proteínas BLUF y LOV en procariotas.....  | 59 |
| <b>Figura 18.</b> Porcentaje de proteínas BLUF en los filos bacterianos.....  | 62 |
| <b>Figura 19.</b> Distribución de bacterias con secuencias codificantes para proteínas BLUF dentro de los filos bacterianos.....  | 63 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 20.</b> Distribución de bacterias quimiotróficas y fototróficas con secuencias codificantes para proteínas BLUF dentro de los filos bacterianos.....  | 64  |
| <b>Figura 21.</b> Alineamiento múltiple de proteínas BLUF de <i>A. baylyi</i> ADP1 y la región N-terminal de AppA de <i>R. sphaeroides</i> generado por Clustal W .....   | 69  |
| <b>Figura 22.</b> Alineamiento múltiple de dominios BLUF putativos y árbol filogenético de algunos miembros de la clase <i>Gammaproteobacteria</i> .....  | 73  |
| <b>Figura 23.</b> Modelo del sistema de regulación de la expresión de genes de fotosíntesis en <i>R. sphaeroides</i> .....  | 78  |
| <b>Figura 24.</b> Modelo del sistema YcgF/YcgE de <i>E.coli</i> .....   | 79  |
| <b>Figura 25.</b> Esquema utilizado para la construcción de plásmidos y la generación de mutantes noqueadas en genes individuales codificantes para proteínas BLUF en <i>A. baylyi</i> ADP1 y confirmación de las mismas..... | 93  |
| <b>Figura 26.</b> Esquema de las construcciones generadas para la obtención de mutantes deleciones en uno, dos y tres genes codificantes para proteínas BLUF en <i>A. baylyi</i> ADP1 .....                                   | 96  |
| <b>Figura 27.</b> Curva de crecimiento de <i>A. baylyi</i> ADP1 en luz y oscuridad.....   | 99  |
| <b>Figura 28.</b> Formación de biofilm de <i>A. baylyi</i> ADP1 en condiciones de luz y oscuridad.....  | 101 |
| <b>Figura 29.</b> Crecimiento y expresión de <i>lipA</i> de AAC320-1 en condiciones de luz y oscuridad .....  | 102 |
| <b>Figura 30.</b> Producción de sideróforos de tipo catecol en <i>A. baylyi</i> ADP1 en condiciones de luz y oscuridad .....  | 103 |
| <b>Figura 31.</b> Efecto de la luz blanca en el <i>twitching</i> de <i>A. baylyi</i> ADP1 .....   | 104 |
| <b>Figura 32.</b> Concentración de ramnosa en sobrenadantes de <i>A. baylyi</i> ADP1 en luz y oscuridad .....   | 105 |
| <b>Figura 33.</b> Frecuencia de transformación de <i>A. baylyi</i> ADP1 en luz y oscuridad.....   | 106 |
| <b>Figura 34.</b> Efecto de la luz azul y roja en la motilidad tipo <i>twitching</i> de <i>A. baylyi</i> ADP1 .....   | 108 |
| <b>Figura 35.</b> Efecto de la luz azul y la temperatura en la motilidad tipo <i>twitching</i> en <i>A. baylyi</i> ADP1 .....   | 109 |
| <b>Figura 36.</b> Efecto del hierro y la luz azul en la motilidad tipo <i>twitching</i> en <i>A. baylyi</i> ADP1...110  |     |
| <b>Figura 37.</b> Efecto de la luz azul en la motilidad tipo <i>twitching</i> en <i>A. baylyi</i> ADP1 y sus mutantes simples.....  | 113 |
| <b>Figura 38.</b> Efecto de la luz azul en la motilidad tipo <i>twitching</i> de <i>A. baylyi</i> ADP1 y las mutantes noqueadas simple (B++M1), doble (B++M2) y triple (B++M3) .....  | 114 |

**Figura 39.** Efecto de la luz azul en la motilidad tipo *twitching* de *A. baylyi* ADP1, sus mutantes noqueadas simples, su mutante triple y cepas complementadas.....116

**Figura 40.** Efecto de la luz azul en la expresión de ACIAD1499 ACIAD2110, ACIAD2125 y ACIAD2129 .....118

**Figura 41.** Esquema de regulación de la motilidad tipo *twitching* mediada por luz azul en *A. baylyi* ADP1 ..... 119

**Figura 42.** Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas correspondientes a diez genomas de *Acinetobacter* para *luxI* y a 9 genomas de *Acinetobacter* para *luxR*.....125

**Figura 43.** Secuencias nucleotídicas de genes *luxI* y *luxR* y las correspondientes secuencias aminoacídicas de las cepas de *Acinetobacter* RUH 0134, RUH 0503, RUH 0509, RUH 0584 y RUH 0875..... 129

**Figura 44.** Geles de SDS-PAGE 20% de proteínas totales de *E. coli* M15 conteniendo pAMB2, pAMB3, pAMB4 o pAMB5.....134

**Figura 45.** Geles de SDS-PAGE 12% de proteínas totales de *E. coli* M15 conteniendo pAMM1, pAMM2, pAMM3 o pAMM4 cuando fueron inducidas con 0,3 mM de IPTG y crecidas a 25°C .....137

---

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 1.</b> Clasificación del género <i>Acinetobacter</i> .....  | 3   |
| <b>Tabla 2.</b> Factores de virulencia de <i>A. baumannii</i> .....  | 7   |
| <b>Tabla 3.</b> Familias de fotorreceptores .....  | 23  |
| <b>Tabla 4.</b> Cepas bacterianas utilizadas en el capítulo 1.....   | 37  |
| <b>Tabla 5.</b> Perfil de resistencia a antibióticos de cepas de <i>Acinetobacter</i> .....                              | 43  |
| <b>Tabla 6.</b> Marcadores fenotípicos relacionados con virulencia en cepas de <i>Acinetobacter</i> .....                | 48  |
| <b>Tabla 7.</b> Número y arquitectura de proteínas BLUF en bacterias quimiotróficas .....                                | 66  |
| <b>Tabla 8.</b> Porcentaje de bacterias quimiotróficas de acuerdo a la frecuencia de proteínas BLUF.....                 | 68  |
| <b>Tabla 9.</b> Proteínas BLUF activas.....  | 77  |
| <b>Tabla 10.</b> Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en el capítulo 3 .....   | 83  |
| <b>Tabla 11.</b> Oligonucleótidos utilizados en el capítulo 3.....   | 94  |
| <b>Tabla 12.</b> Respuesta a la luz de procesos fisiológicos en <i>A. baylyi</i> ADP1.....                               | 107 |
| <b>Tabla 13.</b> Oligonucleótidos utilizados en el anexo 2.....  | 133 |
| <b>Tabla 14.</b> Condiciones y resultados de la expresión de proteínas BLUF en <i>E. coli</i> M15 .....                  | 135 |
| <b>Tabla 15.</b> Condiciones de la expresión de proteínas BLUF en <i>E. coli</i> M15 (pAMM1, pAMM2, pAMM3 o pAMM4) ..... | 136 |

## ABREVIATURAS

°C: grados centígrados

**3-OH-AHL:** N-(3-hidroxi)-L-homoserino lactona

**3-OH-C<sub>12</sub>AHL:** N-(3-hidroxi-dodecanoil)-L-homoserino lactona

**3-OH-C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>AHL:** N-(3-hidroxi)-L-homoserino lactona con cadena lateral de 6 a 10 carbonos en C-3

**3-oxo-AHL:** N-(3-oxo)-L-homoserino lactona

**3-oxo-C<sub>12</sub>AHL:** N-(3-oxo-dodecanoil)-L-homoserino lactona

**3-oxo-C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>AHL:** N-(3-oxo)-L-homoserino lactona con cadena lateral de 4 a 12 carbonos en C-3

**3-oxo-C<sub>6</sub>AHL:** N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserino lactona

**3-oxo-C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>AHL:** N-(3-oxo)-L-homoserino lactona con cadena lateral de 6 a 8 carbonos en C-3

**Ac:** *Acidobacteria*

**AC:** adenilato ciclasa

**Acb:** compejo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii*

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ácido desoxirribonucleico copia

**AFLP:** longitud de fragmento de polimorfismo amplificado (*amplified fragment length polymorphism*)

**AHL:** acil homoserino lactona

**AMK:** amikacina

**Amp:** ampicilina

**AMPc:** adenosina monofosfato cíclica

**AMS:** ampicilina-sulbactam

**ARDRA:** análisis de restricción de la amplificación del ADN ribosomal 16s (*amplified 16s ribosomal DNA restriction analysis*)

**ARN:** ácido ribonucleico

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**ARNr:** ácido ribonucleico ribosomal

**Asn:** Asparragina

**At:** *Actinobacteria*

**ATP:** adenosina trifosfato

**B:** *Bacteroidetes*

**BlSA:** sensor de luz azul A (*blue light sensing A*)

**BLUF:** flavinas sensibles a la luz azul (*blue light sensing using flavin*)

**BR:** bacteriorodopsinas

**c.s.p.:** cantidad suficiente para

**C:** *Cyanobacteria*

**C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>AHL:** acil homoserino lactona con cadena lateral de 4 a 8 carbonos en C-3

**C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>AHL:** acil homoserino lactona con cadena lateral de 6 a 14 carbonos en C-3

**c-di-GMP:** diguanilato monofosfato cíclico

**Ch:** *Chlorobi*

**cm:** centímetros

**col.:** colaboradores

**CRY:** criptocromo

**C-terminal:** extremo carboxilo terminal



**CTZ:** cotrimoxazol  
**CTZD:** ceftazidima  
**CV:** cristal violeta  
**dATP:** desoxi-adenosina trifosfato  
**DEPC:** dietilpirocarbonato  
**DHBA:** ácido 2,3 dihidroxibenzóico  
**DMSO:** dimetil sulfóxido  
**dNTPs:** desoxinucleótidos trifosfato  
**DO:** densidad óptica  
**DS:** desvío estándar  
**e<sup>-</sup> :** electrón  
**EAL:** dominio con una secuencia conservada con actividad fosfodiesterasa de c-di-GMP.  
**EDDHA:** ácido etilen-diamino-di hidroxifenil-acético  
**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético  
**Est. sec.:** estructura secundaria  
**FAD:** flavín adenín dinucleótido  
**FMN:** flavín mononucleótido  
**g:** gramo  
**Gen.sp.:** especies genómicas o genoespecies  
**GEN:** gentamicina  
**GGDEF:** dominio con secuencia conservada con actividad diguanilato ciclasa para la síntesis de c-di-GMP.  
**Gln:** glutamina  
**h:** horas  
**H<sup>+</sup>:** protón  
**HCH:** hexaclorociclohexano  
**His:** histidina  
**HK:** histidin quinasa  
**HR:** halorodopsinas  
**HtH:** hélice-giro-hélice (*helix-turn-helix*).  
**i:** sensibilidad intermedia  
**IMI:** imipenem  
**IPTG:** Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido  
**IR:** infrarrojo  
**Kan:** kanamicina  
**kDa:** kilo Daltons  
**l:** litro  
**LED:** diodo emisor de luz (*light emitting diodes*)  
**Leu:** leucina  
**LOV:** luz oxígeno voltaje (*light oxigen voltage*)  
**LPS:** lipopolisacáridos  
**Mb:** mega bases  
**MBP:** proteína de unión a maltosa (*mannose binding protein*)  
**MER:** meropenem  
**Met:** metionina  
**min:** minutos  
**MR:** multirresistente

**N:** *Nitrospira*  
**ND:** no detectado  
**N-terminal:** extremo amino terminal  
**NTIL:** netilmicina  
**OFX:** ofloxacina  
**OHHL:** N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserino lactona  
**OMVs:** vesículas de membrana externa (*outer membrane vesicles*)  
**ONPG:** o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranososa  
**p/v:** peso/volumen  
**P:** *Planctomycetes*  
**pb:** pares de bases  
**PBS:** buffer fosfato salino  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**Phe:** fenilalanina  
**PIP:** piperacilina  
**pNP:** p-nitrofenol  
**PS:** peso seco  
**PYP:** proteína amarilla fotoactiva (*photoactive yellow protein*)  
**qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa  
**QS:** *quorum sensing*  
**R:** resistente  
**RF:** factor de retención  
**rpm:** revoluciones por minuto  
**RP-TLC:** cromatografía en capa delgada de fase reversa (*reverse phase thin layer chromatography*)  
**RR:** regulador de respuesta  
**RT:** retrotranscripción  
**s:** sensible  
**S:** *Spirochaetes*  
**SCHIC:** sensor conteniendo hemo en lugar de cobalamina (*sensor containing heme instead of cobalamin*)  
**SDS-PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio  
**seg:** segundos  
**sergr:** serogrupo  
**SR:** rodopsinas sensoras  
**STAS:** transportador de sulfato y antagonista del factor anti sigma (*sulfate transporter and anti-sigma factor agonist*)  
**sup.:** superficies  
**TAG:** triacilglicerol  
**TBDT:** Transportador dependiente de TonB (*TonB-dependent transporter*)  
**TET o Tet:** tetraciclina  
**TLC:** cromatografía en capa delgada (*thin layer chromatography*)  
**TOBR:** tobramicina  
**Trp:** triptófano  
**Tyr:** tirosina  
**UTIs:** unidades de tratamiento intensivo  
**UV:** ultravioleta  
**v/v:** volumen/volumen

**V:** *Verrucomicrobia*

**vs:** versus

**W:** wat

**WE:** ésteres de cera (*wax esters*)

**WS/DGAT:** WE sintasa/acil-CoA : diacilglicerol aciltransferasa

**WS:** sintasa de ésteres de cera (*wax sintase*)

**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactoprianósido

**$\alpha$ -P:** *Alfaproteobacteria*

**$\beta$ -P:** *Betaproteobacteria*

**$\gamma$ -P:** *Gammaproteobacteria*

**$\delta$ -P:** *Deltaproteobacteria*

## INTRODUCCION

El género *Acinetobacter* está integrado por bacterias Gram-negativas no fermentativas ampliamente distribuidas en la naturaleza y comprende tanto bacterias ambientales como patógenas oportunistas. De acuerdo a la información taxonómica más reciente, los miembros del género *Acinetobacter* pertenecen a la clase *Gammaproteobacteria*, como parte del orden *Pseudomonadales* dentro de la familia *Moraxellaceae*. El interés en especies del género *Acinetobacter* ha ido aumentando debido a sus aplicaciones ambientales y biotecnológicas, como también por ser un patógeno oportunista multirresistente.

Cuatro especies del género *Acinetobacter* (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* sp. nov y *A. nosocomialis* sp. nov) han sido agrupadas en el denominado complejo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (Acb) debido a la imposibilidad de diferenciarlas mediante métodos fenotípicos (Bouvet y Grimont, 1986; Gerner-Smidt y col., 1991). Este complejo ha adquirido gran importancia epidemiológica debido a su persistencia en infecciones intrahospitalarias y su perfil de multirresistencia a los agentes antimicrobianos convencionales, lo que redundo en una gran limitación para su tratamiento. Por lo tanto, se sugiere la conveniencia de abordar el problema apuntando preferentemente hacia las propiedades globales de las infecciones, más que hacia los organismos aislados.

### **1. Historia, taxonomía y características del género *Acinetobacter***

La historia del género *Acinetobacter* comienza en el año 1911 cuando el microbiólogo holandés M.W. Beijerinck describió un organismo aislado de suelo, el cual fue denominado *Micrococcus calcoaceticus*. Durante las siguientes décadas, estas bacterias fueron redescubiertas y renombradas varias veces, lo cual generó una gran confusión a nivel taxonómico. En 1954, J. Brisou y A. R. Prévot crearon el género *Acinetobacter* el cual incluía una colección heterogénea de bacterias saprófitas Gram-negativas, no móviles, que podían ser distinguidas de otras bacterias similares debido a su falta de pigmentación (Brisou y Prevot, 1954). En 1968, estudios nutricionales realizados por Baumann en más de cien cepas del grupo *Moraxella* (bacterias aerobias estrictas, gram-negativas, sin flagelo) demostraron que las cepas que respondían negativamente al test de oxidasa se diferenciaban de las oxidasas positivas y propusieron excluir a estas últimas del género *Acinetobacter* (Baumann, 1968). En 1971 el "Subcomité sobre la Taxonomía de *Moraxella* y Bacterias Aliadas" validó oficialmente la decisión de limitar el género *Acinetobacter* a cepas que respondían

negativamente al test de oxidasa. En 1974 el manual de Bergey's de Bacteriología Sistemática listó al género *Acinetobacter* con la descripción de una única especie, *Acinetobacter calcoaceticus* (Lautrop, 1974). Los ensayos de hibridación de ADN-ADN junto con las características fenotípicas realizados por Bouvet y Grimont permitieron la reorganización de la taxonomía del género *Acinetobacter* (Bouvet y Grimont, 1986).

En la actualidad, el género *Acinetobacter* está integrado por bacterias Gram-negativas, aerobias estrictas, no fermentativas, catalasa positiva, oxidasa negativa, con contenido de G+C entre 39% y 47%, no poseen flagelo, no forman esporas, poseen una morfología coco bacilar y un crecimiento entre 20°C y 42°C (Towner, 2006; Peleg y col., 2008). Si bien el género *Acinetobacter* fue clasificado inicialmente dentro de la familia *Neisseriaceae*, estudios de ARNr 16S junto con hibridación ADN-ARNr permitieron evidenciar la heterogeneidad de esta familia y se los clasificó dentro de la nueva familia *Moraxellaceae*. Esta familia contiene a los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* y organismos relacionados; y se encuentra dentro de la clase *Gamaproteobacteria*, orden *Pseudomonadales* (Rossau y col., 1991).

Tradicionalmente, la definición de especie en el género *Acinetobacter* se basaba en el grado de similitud en sus características fenotípicas, actualmente se considera a la hibridación ADN-ADN como patrón de oro para la identificación de especies de *Acinetobacter*. La definición molecular considera que una especie debe incluir a todas las cepas que posean una relación ADN-ADN mayor o igual al 70% y un  $\Delta T_m$  menor o igual a 5°C. Además, se han utilizado otros métodos genotípicos para la identificación de especies del género *Acinetobacter*, dentro de los cuales se encuentran: *amplified fragment length analysis* (AFLP), *amplified 16s ribosomal DNA restriction analysis* (ARDRA) y análisis de la secuencia de ADN correspondiente al ARNr 16s. De esta manera, se han descrito 35 especies en el género *Acinetobacter*, de las cuales 28 son especies nombradas (<http://www.bacterio.cict.fr/a/acinetobacter.html>) y 7 son especies genómicas (Gen.sp.) con designaciones provisionarias (Dijkshoorn y col., 2007) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación del género *Acinetobacter*

| Especie  | Fuente                             | Referencia  |
|--|------------------------------------|---|
| <b>Especies con nombres asignados</b>                      |                                    |   |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>                             | Humanos*, suelo, carne y vegetales | Bouvet y Grimont, 1986; Tjernberg y Ursing, 1989; Houang y col., 2001                     |
| <i>Acinetobacter baylyi</i>                                | Lodo y suelo                       | Carr y col., 2003; Vaneeccoutte y col., 2006  |
| <i>Acinetobacter beijerinckii</i>                          | Humanos* ‡, caballos, suelo y agua | Nemec y col., 2009  |
| <i>Acinetobacter bereziniae</i>                            | Humanos*, suelo y vegetales        | Bouvet y Grimont, 1986; Tjernberg y Ursing, 1989; Houang y col., 2001; Nemec y col., 2010 |
| <i>Acinetobacter bouvetii</i>                              | Lodo                               | Carr y col., 2003   |
| <i>Acinetobacter brisouii</i>                              | Pantano                            | Anandham y col., 2010   |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>                         | Suelo y humanos*                   | Bouvet y Grimont, 1986; Tjernberg y Ursing, 1989  |
| <i>Acinetobacter gerneri</i>                               | Lodo                               | Carr y col., 2003   |
| <i>Acinetobacter guillouiae</i>                            | Humanos * y animales               | Bouvet y Grimont, 1986; Tjernberg y Ursing, 1989; Nemec y col., 2010                      |
| <i>Acinetobacter grimontii</i>                             | Lodo                               | Carr y col., 2003   |
| <i>Acinetobacter gyllenbergii</i>                          | Humanos *                          | Nemec y col., 2009  |
| <i>Acinetobacter haemolyticus</i>                          | Humanos *                          | Bouvet y Grimont, 1986; Tjernberg y Ursing, 1989  |
| <i>Acinetobacter indicus</i>                               | Sitio de volcado de HCH, India     | Malhotra y col., 2012   |
| <i>Acinetobacter johnsonii</i>                             | Humanos * y animales               | Bouvet y Grimont, 1986; Tjernberg y Ursing, 1989  |
| <i>Acinetobacter junii</i>                                 | Humanos *                          | Bouvet y Grimont, 1986; Tjernberg y Ursing, 1989  |
| <i>Acinetobacter kwoffii</i>                               | Humanos * y animales               | Bouvet y Grimont, 1986; Tjernberg y Ursing, 1989  |
| <i>Acinetobacter nosocomialis</i>                          | Humanos *                          | Tjernberg y Ursing, 1989; Nemec y col., 2011  |
| <i>Acinetobacter parvus</i>                                | Humanos * y animales               | Nemec y col., 2003  |
| <i>Acinetobacter pittii</i>                                | Humanos *, suelo y vegetales       | Tjernberg y Ursing, 1989; Nemec y col., 2011  |
| <i>Acinetobacter radioresistens</i>                        | Humanos *, suelo y algodón         | Bouvet y Grimont, 1986; Tjernberg y Ursing, 1989; Nishimura y col., 1988                  |
| <i>Acinetobacter rudis</i>                                 | Leche y agua                       | Vas-Moreira y col., 2011  |
| <i>Acinetobacter schindleri</i>                            | Humanos *                          | Nemec y col., 2001  |
| <i>Acinetobacter soli</i>                                  | Suelo                              | Kim y col., 2008  |
| <i>Acinetobacter tandoii</i>                               | Lodo                               | Carr y col., 2003   |
| <i>Acinetobacter tjernbergiae</i>                          | Lodo                               | Carr y col., 2003   |
| <i>Acinetobacter townneri</i>                              | Lodo                               | Carr y col., 2003   |
| <i>Acinetobacter ursingii</i>                              | Humanos *                          | Nemec y col., 2001  |
| <i>Acinetobacter venetianus</i>                            | Agua de mar                        | Vaneechoutte y col., 2009   |
| <b>Especies genómicas con designaciones provisionarias</b> |                                    |   |
| <i>Acinetobacter</i> Gen.sp. 6                             | Humanos *                          | Bouvet y Grimont, 1986; Tjernberg y Ursing, 1989  |
| <i>Acinetobacter</i> Gen.sp. 13BJ/14TU <sup>o</sup>        | Humanos *                          | Bouvet y Jeanjean, 1989; Tjernberg y Ursing, 1989   |
| <i>Acinetobacter</i> Gen.sp. 14BJ                          | Humanos *                          | Bouvet y Jeanjean, 1989   |
| <i>Acinetobacter</i> Gen.sp. 15BJ                          | Humanos *                          | Bouvet y Jeanjean, 1989   |
| <i>Acinetobacter</i> Gen.sp. 16                            | Humanos * y vegetales              | Bouvet y Jeanjean, 1989; Houang y col., 2001  |
| <i>Acinetobacter</i> Gen.sp. 17                            | Humanos * y suelo                  | Bouvet y Jeanjean, 1989; Houang y col., 2001  |
| <i>Acinetobacter</i> Gen.sp. 15TU                          | Humanos *                          | Tjernberg y Ursing, 1989  |

\* muestras de pacientes. ‡ muestras del personal del hospital (piel). HCH: hexaclorociclohexano.

<sup>o</sup> Designaciones para la misma genoespecie denominadas con las iniciales del autor, Bouvet y Jeanjean, (BJ) o Tjernberg y Ursing (TU).

## 2. Impacto clínico de *Acinetobacter*

En la década de 1970 *Acinetobacter* spp. comenzó a ser reconocido como un importante patógeno oportunista intrahospitalario debido a la aparición de cepas multirresistentes a antibióticos convencionales, lo que desencadenó la aparición de brotes de infección que afectaron a muchos pacientes en unidades de tratamiento intensivo (UTIs) (Vincent y col., 1995; Poirel y col., 2003). Cuatro especies del género *Acinetobacter* (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* y *A. nosocomialis*) forman el complejo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (Acb), debido a que no pueden ser diferenciadas por sus características fenotípicas (Gerner-Smidt y col., 1991). Sin embargo, esta agrupación no es apropiada desde el punto de vista clínico, ya que este complejo combina una especie ambiental (*A. calcoaceticus*) con las tres especies clínicas más relevantes (*A. baumannii*, *A. pittii* y *A. nosocomialis*). Estas últimas son los principales causantes de infecciones intrahospitalarias del género, ya que adquieren resistencia a los más potentes antibióticos y son capaces de sobrevivir tiempos prolongados en el ambiente hospitalario, lo que favorece su persistencia (Bonomo y Szabo, 2006; Joly-Guillou, 2005).

Las infecciones provocadas por *Acinetobacter* pueden producirse en cuatro grupos de riesgo de la población: pacientes en UTIs, pacientes hospitalizados fuera de UTIs, pacientes con infecciones adquiridas en la comunidad (neumonía, meningitis) y pacientes infectados luego de desastres naturales.

### 2.1. Infecciones nosocomiales

Los miembros del género *Acinetobacter* son patógenos oportunistas implicados en procesos infecciosos que afectan principalmente a pacientes en UTIs. En el ambiente hospitalario las infecciones por *Acinetobacter* incluyen: neumonía asociada a ventilación mecánica, infección en piel o tejidos blandos, infecciones en heridas, infecciones urinarias, meningitis secundaria y bacteriemia. Estas infecciones son principalmente causadas por *A. baumannii*, siendo esta la especie de mayor importancia clínica. Dentro de los factores de riesgo que predisponen a los pacientes a infectarse con *A. baumannii* se encuentran los tratamientos invasivos prolongados, exposición a antibióticos de amplio espectro, la cirugía, uso de prótesis (catéteres ventriculares, intravasculares o urinarios) o tubos endotraqueales, heridas o quemaduras y ser recién nacido prematuro. Además, las manos del personal hospitalario son la principal fuente de transmisión de este

patógeno oportunista, por lo que es fundamental incrementar las normas de higienización del personal.

El impacto clínico de *A. baumannii* está en discusión. Algunos afirman que al ser un patógeno oportunista que afecta principalmente a pacientes que tienen una enfermedad de base con un mal pronóstico, la alta mortalidad observada en pacientes infectados con *A. baumannii* se debe a la enfermedad de base (Blot y col., 2003). Sin embargo, otros estudios atribuyen un aumento de la mortalidad debido a la infección con *A. baumannii* específicamente (Falagas y Rafailidis, 2007).

## **2.2. Infecciones adquiridas en la comunidad**

Desde 1980 hasta el año 2005 se han reportado más de cien casos de neumonía adquirida en la comunidad causadas por *Acinetobacter*. Los casos de neumonía aguda se dieron en pacientes alcohólicos, diabéticos, con cáncer o enfermedad broncopulmonar y los altos grados de mortalidad se relacionaron con las características del paciente y la demora en el tratamiento (Joly-Guillou, 2005). La neumonía adquirida en la comunidad causada por *A. baumannii* es acompañada por una alta incidencia de bacteremia y un alto grado de mortalidad (40 – 64%). Generalmente, la presencia de bacteremia ha sido reportada en países con clima tropical, como ser el sudeste asiático y Australia (Wang y col., 2002; Anstey y col., 2002). Además, debido a que se ha aislado *A. baumannii* en piojos, pulgas y garrapatas, se piensa que podrían estos servir de vectores para la transmisión y provocar las infecciones en la comunidad, principalmente en personas sin hogar (La Scola y col., 2001).

## **2.3. Infecciones asociadas a desastres naturales**

Los reportes de las guerras de Vietnam, Iran-Iraq y del Golfo permitieron determinar que *Acinetobacter* es uno de los bacilos Gram-negativos más encontrados en heridas de guerra, con la consiguiente infección cruzada de los pacientes militares lesionados al ser repatriados de las regiones de combate (Towner, 2009). Entre 2003 y 2004 el número de bacteriemias provocadas por *Acinetobacter* supera a lo reportado años anteriores, lo que sugiere que la contaminación ambiental por heridas de guerra es una potencial fuente de infección (CDC, 2004). Considerando que *A. baumannii* es ubicuo, se postuló que este podría infectar al momento de la herida, desde piel colonizada o suelo contaminado. Sin embargo, luego se demostró que la mayor adquisición de *A. baumannii* se produce en los centros de salud militares y por lo tanto se requieren nuevas



estrategias para prevenir la transmisión de este patógeno en los hospitales del campo de combate (Scott y col., 2007).

### 3. Patogenicidad y factores de virulencia

El interés en especies del género *Acinetobacter*, particularmente en *A. baumannii*, ha ido aumentando debido a su capacidad de desarrollar resistencia a todos los antibióticos disponibles en la actualidad. Si bien se han estudiado una serie de mecanismos que podrían estar implicados en la colonización, infección y propagación de este patógeno oportunista, poco se sabe del mecanismo molecular de la patogénesis.

La reciente secuenciación de *A. baumannii* ATCC 17978 permitió identificar 16 islas genómicas que contenían genes asociados a la virulencia (Smith y col., 2007). Entre estos se encuentra un grupo de factores que contribuyen a la persistencia de *A. baumannii* en el ambiente y a la colonización e invasión del huésped (Tabla 2). A nivel del ambiente hospitalario, la persistencia de *A. baumannii* se debe a su capacidad de formar biofilms y resistir a condiciones de desecación en superficies abióticas, lo cual permite la colonización de instrumentos médicos y superficies ambientales (Tomaras y col, 2003; Loehfelm y col., 2008). Para la colonización del hospedador debe adherirse a las células de la piel o mucosas y ser capaz de resistir a los antibióticos, agentes inhibitorios y a las condiciones que caracterizan a estas superficies (Lee y col., 2008; Gaddy y col., 2009; Wendt y col., 1997; Perez y col., 2007). Debido a que la formación de biofilm está regulada por un sistema de densidad poblacional, este también se encuentra involucrado tanto en la supervivencia en el ambiente hospitalario, como también en la colonización del huésped. Estudios *in vitro* han identificado algunos factores implicados en la infección de *A. baumannii*. Entre estos se encuentra la proteína de membrana externa (OmpA) la cual si bien participaba de manera parcial en la formación de biofilm en superficies abióticas, es indispensable para la adhesión e invasión de células epiteliales e induce apoptosis en las mismas (Choi y col., 2005; Choi y col., 2008). Además, el sistema de captación de hierro (Actis y col., 1993) y la resistencia a la actividad bactericida del suero (Kim y col., 2009) son de importancia para la supervivencia en la sangre durante la bacteremia. Todo esto explica la gran capacidad de adaptación de *A. baumannii* a las diferentes condiciones con las que se encontrará tanto en el ambiente, en la colonización y posterior invasión del hospedador. Esto junto a su perfil de multirresistencia a los antibióticos, explica el éxito de *A. baumannii* en las infecciones intrahospitalarias.

**Tabla 2. Factores de virulencia de *A. baumannii***

| Factor de virulencia                           | Mecanismo en el que participan                                 |
|--|--|
| <i>pili</i> CsuA/BABCDE <i>chaperona-usher</i> | Biofilm (sup. abióticas)                                       |
| <i>Biofilm-associated protein</i> (Bap)        | Biofilm, maduración (sup. abióticas)                           |
| Sistema de dos componentes BfmRS               | Biofilm (sup. abióticas)                                       |
| OmpA   | Adherencia (sup. bióticas) /Apoptosis/<br>Resistencia al suero |
| Sideróforos                                    | Adquisición de hierro  |
| Sistema de densidad poblacional / QS           | Biofilm (sup. abióticas)                                       |
| Polisacáridos capsulares                       | Evasión del sistema inmune                                     |
| Lipopolisacáridos                              | Evasión del sistema inmune                                     |

### 3.1. Regulación de la formación de biofilm en *A. baumannii*

Un biofilm es una comunidad compleja de microorganismos adheridos entre sí y/o a una superficie o interfase encerrados en una estructura tridimensional organizada en donde las células están en contacto entre sí y encerradas por una matriz extracelular que puede estar compuesta por hidratos de carbono, ácidos nucleicos, proteínas y otras macromoléculas (Costerton y col., 1999). Para que se produzca la formación de biofilm y su maduración es necesario que sucedan una serie de eventos moleculares que mantienen este proceso bajo un estricto control. Los factores que afectan la formación de biofilm son: disponibilidad de nutrientes, proteínas de la superficie bacteriana, apéndices celulares, sistemas de densidad poblacional (o *quorum sensing*, QS) y macromoléculas de secreción (polisacáridos y ácidos nucleicos).

#### 3.1.1. Adherencia a superficies abióticas

Estudios realizados en *A. baumannii* ATCC 19606 demostraron que este patógeno es capaz de formar biofilm en superficies de vidrio y sobre distintos plásticos (poliestireno, polipropileno y teflón), algunos de los cuales son utilizados en la fabricación de dispositivos médicos (Tomaras y col., 2003). Se comprobó que la adhesión se debía a un tipo especial de *pili* producto de la expresión del operón Csu (*csuA/BABCDE*), el cual corresponde a un sistema de secreción de tipo *chaperona-usher*. La mutación en el gen *csuE*, provocó la falta de expresión del operón, lo que resultó en la falta de producción de *pili* y la consecuente pérdida de las propiedades adhesivas (Tomaras y col., 2003). Trabajos posteriores revelaron que la expresión del operón Csu, a su vez, estaba regulada por un sistema de dos componentes constituido por una proteína sensora con

actividad quinasa, codificada por *bfmS* y una proteína reguladora de la respuesta, codificada por *bfmR* (Tomaras y col., 2008). Debido a que la inactivación de *bfmS* no anulaba completamente la formación de biofilm, los autores sugirieron que debería existir una comunicación cruzada de otros sensores con BfmR, permitiendo que diferentes estímulos regulen la formación de biofilm mediante el sistema BfmSR (Gaddy y Actis, 2009). Además de la formación de *pili*, la proteína de superficie Bap fue identificada como necesaria para mantener la arquitectura del biofilm maduro de *A. baumannii* 307-0294 sobre superficies de vidrio (Loehfelm y col., 2008).

### 3.1.2. Adherencia a superficies bióticas

La adhesión de la bacteria a las células epiteliales es un paso fundamental para la colonización y posterior infección. Debido a que *A. baumannii* afecta principalmente el tracto respiratorio, la mayoría de los estudios se realizaron sobre líneas celulares epiteliales. Se demostró así que tanto la adhesión de este patógeno a células del epitelio bronquial humano, como también la formación de biofilm sobre plástico, se encuentran aumentadas por la expresión de *bla<sup>PER-1</sup>*, gen que codifica para una beta-lactamasa de amplio espectro (Lee y col., 2008). Estos resultados podrían explicar el éxito de este patógeno para persistir en ambientes hospitalarios y en el hospedador frente la presencia de antibióticos. La adhesión a las superficies bióticas podría producirse a través de adhesinas u otros componentes presentes en la superficie bacteriana como *pili*, flagelo o cápsula.

Estudios en *A. baumannii* ATCC 19606 demostraron que esta cepa es capaz de adherirse y formar biofilm sobre células del epitelio alveolar humano por medio de una porina ampliamente distribuida entre las bacterias Gram-negativas (OmpA), la cual es indispensable para la adherencia a superficies bióticas (filamentos fúngicos y células epiteliales) en un proceso completamente independiente del *pili* producto del operón *Csu* (Gaddy y col., 2009). OmpA participa en el estadio temprano de la infección por *A. baumannii*, permitiendo la adhesión a células epiteliales, la unión del factor H con la consecuente evasión del ataque del sistema de complemento (Kim y col., 2009) y la inducción de la apoptosis de las células del hospedador (Gaddy y col., 2009). Estudios recientes demostraron que *A. baumannii* secreta vesículas de membrana externa (OMVs) que contienen a la proteína OmpA (Jin y col., 2011). Las OMVs interactúan con los *rafts* lipídicos de la célula hospedadora, descargan los factores de virulencia que transportan y, una vez en la célula hospedadora, OmpA produce su efecto citotóxico. Por lo tanto, el transporte de factores de

virulencia mediado por OMVs, que incluyen tanto OmpA como varias proteínas putativas asociadas a la virulencia, contribuye a la patogénesis de *A. baumannii* (Kwon y col., 2009).

### 3.2. Adquisición de hierro – Sideróforos

El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de los microorganismos, con la excepción de los lactobacilos. Este nutriente participa en los principales procesos biológicos como ser la respiración, transporte de oxígeno, síntesis de ADN, regulación de la expresión génica, entre otros (Andrews y col., 2003). Cuando un patógeno bacteriano invade la célula hospedadora, esta presentará un desafío nutricional para el patógeno, ya que posee un citoplasma con bajos niveles de hierro libre debido al almacenamiento del metal mediante su unión a lactoferrina, transferrina y hemoglobina (Ratledge y Dover, 2000). Las bacterias sobreviven en condiciones de limitación de hierro debido a que han desarrollado sistemas especiales para la captación de este nutriente que les permiten recuperarlo de las proteínas antes mencionadas. Uno de estos sistemas se basa en la producción de moléculas de bajo peso molecular con alta afinidad por hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ), denominadas sideróforos. Los sideróforos utilizan los ligandos más efectivos para su unión al hierro: hidroxamatos,  $\alpha$ -hidroxicarboxilatos y catecoles (Winkelmann, 2002). En bacterias Gram-negativas, el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo será captado por un receptor de membrana externa que permitirá el pasaje del complejo al periplasma (Figura 1). Este transportador se denomina *TonB-dependent transporter* (TBDT), debido a que la energía necesaria para este transporte proviene del potencial de la membrana interna y requiere del sistema TonB-ExbB-ExbD para transmitir la energía a la membrana externa. Luego, proteínas de unión del periplasma se unirán al complejo y lo llevarán hacia el transportador ABC que permitirá que el complejo llegue al citoplasma, donde probablemente este se disocia por reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  y queda disponible para ser incorporado en enzimas o bien ser depositado (Andrews y col., 2003). Para la generación de dichos depósitos las bacterias producen proteínas (ferritinas, bacterioferritinas) y de esta manera podrán crecer cuando se encuentren en ambientes carentes del nutriente. Debido a que el exceso de  $\text{Fe}^{2+}$  podría inducir la generación de radicales dañinos para la célula, las bacterias producen proteínas que permiten la detoxificación del hierro (Dps). Además, se identificó un regulador general del metabolismo del hierro (Fur) que permitiría regular la expresión de los genes con el fin de asegurar que la captación de hierro, almacenamiento y consumo se produzca en función de la disponibilidad del nutriente y que la concentración intracelular no alcance los niveles tóxicos (Andrews y col., 2003). Ante el

exceso de  $\text{Fe}^{2+}$ , este se une al represor Fur e interaccionan con el promotor ( $P_{\text{fur}}$ ), inhibiendo la transcripción de los genes del sistema de captación de hierro.

Yamamoto y col. reportaron que *A. baumannii* ATCC 19606 producía y secretaba un sideróforo que contiene catecol e hidroxamato como grupos funcionales, al que denominaron acinetobactina (Yamamoto y col., 1994). Estudios posteriores evidenciaron que el proceso de adquisición de hierro mediado por acinetobactina estaba codificado en un locus policistrónico que incluía genes para la biosíntesis del sideróforo y para su transporte. Mutaciones en genes de este locus provocaban la incapacidad de crecer en condiciones de limitación de hierro (Dorsey y col., 2004).

El estudio de la formación de biofilm de *A. baumannii* ATCC 19606 en superficies abióticas bajo condiciones de limitación de hierro, permitieron evidenciar que la formación de biofilm se encuentra aumentada en estas condiciones (Tomaras y col., 2003). Esto es de gran importancia debido a que el patógeno se encuentra en un entorno con limitación de hierro, tanto en el ambiente hospitalario como en el hospedador.

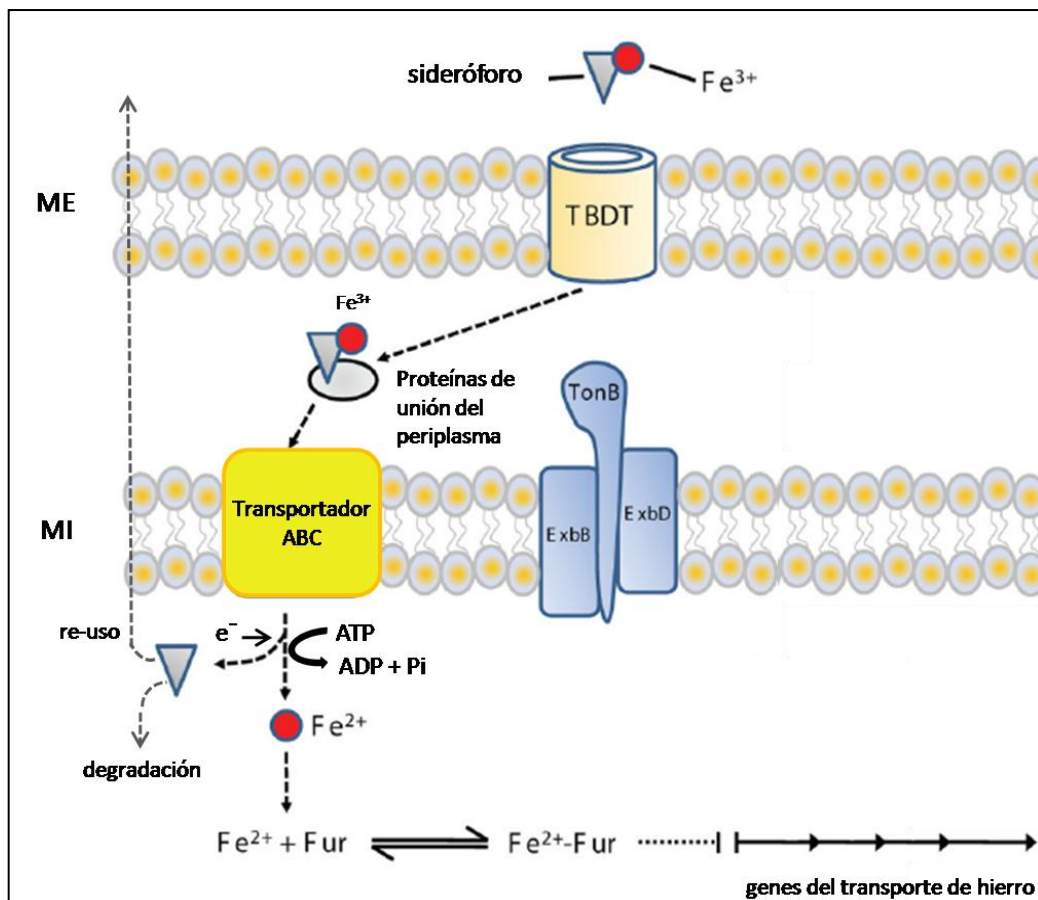
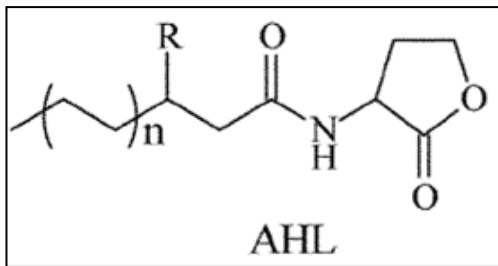


Figura 1. Esquema de la captación de hierro mediada por sideróforos en bacterias Gram-negativas. Adaptación de Andrews y col, 2003 y Noinaj y col., 2010.

### 3.3. Sistemas de densidad poblacional (*Quorum sensing*, QS)

En la actualidad es ampliamente aceptado que las bacterias no son entidades aisladas, sino que están en constante comunicación con el fin de adaptarse a las condiciones ambientales. El principal mecanismo de comunicación célula-célula implica la síntesis, liberación y detección de moléculas señal (González y Keshavan, 2006). El término *quorum sensing* (QS) fue propuesto por Fuqua para describir la capacidad de determinadas bacterias de monitorear su densidad de población y regular la expresión génica apropiadamente (Fuqua y col., 1994). Los sistemas de QS son utilizados por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, pero emplean distintas moléculas señal. Mientras que las bacterias Gram-positivas utilizan pequeños péptidos, las Gram-negativas utilizan derivados de ácidos grasos, en particular diversas acil homoserino lactonas (AHL), las cuales varían en longitud, oxidación y grado de saturación del grupo acilo (Figura 2).

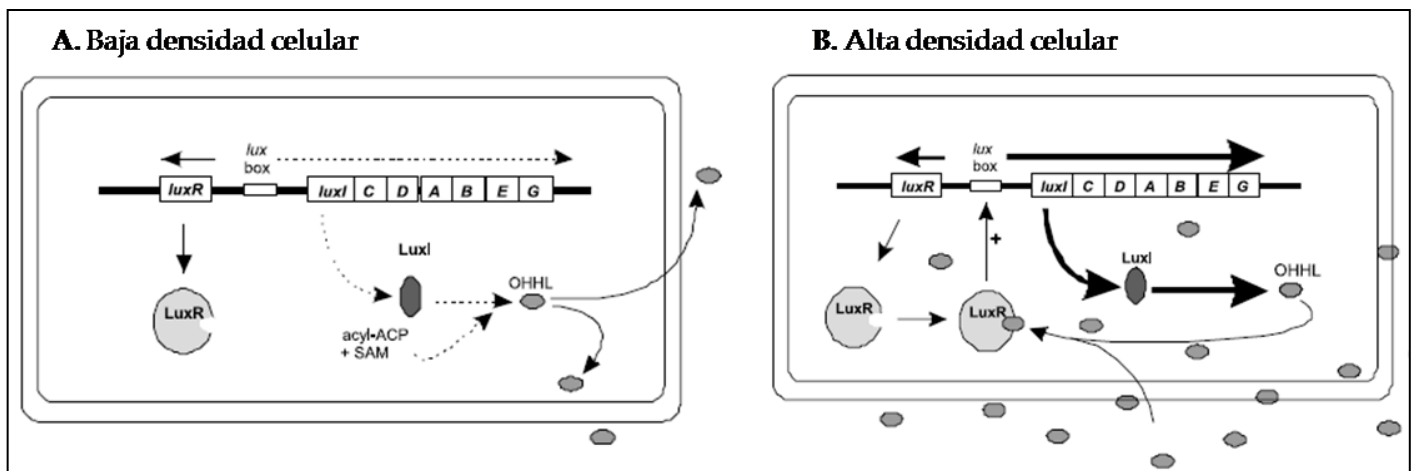


**Figura 2. Estructura de acil homoserino lactona (AHL) utilizada como autoinductor en el típico sistema de QS de bacterias Gram-negativas.** n: cadena de largo variable. R: sustituyente del carbono 3, hidroxilo (OH), ceto (O) o hidrógeno (H).

El primer sistema de QS descrito fue el de la bacteria marina *Vibrio fischeri*. En 1970 Nealson y col. observaron que los cultivos de esta bacteria sufrían un retraso en la aparición de la luminiscencia, produciéndose este fenómeno sólo al llegar a una densidad poblacional determinada. Además, observaron que la luminiscencia también se producía cuando cultivos en fase logarítmica temprana eran inducidos con sobrenadantes de cultivos de fase exponencial, mientras que esta respuesta no se observó cuando los sobrenadantes provenían de otra cepa (*Vibrio harveyi*) (Nealson y col., 1970). Los autores propusieron que un mensajero molecular, al que denominaron autoinductor, permitía a la bacteria monitorear su propia densidad poblacional y regular la expresión de genes responsables de la luminiscencia. Estudios posteriores confirmaron esta predicción e identificaron al autoinductor producido por *V. fischeri* como una AHL (Eberhard y col., 1981)

Cuando *Vibrio fischeri* se encuentra libre en el mar (a baja densidad celular) no es luminiscente. Sin embargo, al establecer una relación simbiótica con algunos peces o especies de calamar, la bacteria pasa a estar en altas densidades celulares en los órganos del animal y genera luminiscencia. El caso más estudiado es el de *V. fischeri* con el calamar hawaiano *Euprymna scolopes* (Ruby, 1999). Todos

los días al amanecer, el calamar expulsa entre el 90% y 95% de la población bacteriana hacia el mar. Durante el curso del día, las células remanentes de *V. fischeri* proliferan y aumentan su densidad celular, reestableciendo la luminiscencia hacia la noche (Ruby y Asato, 1993). Mediante esta asociación el calamar se camufla de los predadores debido a que al generar luz durante la noche no produce la sombra creada por la luz de la luna y, por otro lado, *Eu. Scolopes* provee nutrientes a la bacteria. Las bases moleculares del sistema de QS de *V. fischeri* constituye el paradigma de los sistemas regulados por AHL (Figura 3). El grupo de genes de bioluminiscencia está formado por ocho genes *lux* (*luxABCDEG*, *luxI* y *luxR*) ordenados en dos operones que se transcriben en dirección opuesta (Engebrecht y Silverman, 1984). Los genes *luxA* y *luxB* codifican para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la luciferasa, respectivamente; *luxC*, *luxD* y *luxE* codifican para un complejo multienzimático responsable de la síntesis del sustrato aldehído utilizado por la luciferasa y *luxG* codifica para una flavin reductasa. Los productos de los genes *luxI* y *luxR* se encargan de regular la expresión de luciferasa mediante la síntesis y respuesta al autoinductor (Whitehead y col., 2001).



**Figura 3.** Esquema de la regulación de la bioluminiscencia en *V. fischeri* por QS. **A.** A baja densidad poblacional, la producción de autoinductor (OHHL) es basal y este se diluye en el medio. **B.** A altas densidades celulares se alcanza la concentración crítica de OHHL, este se une a LuxR y ambos interaccionan con el *lux box*, estimulando la transcripción de *luxICDABEG* y generando una amplificación de la señal OHHL y la emisión de luz (Whitehead y col., 2001).

El sistema de QS de *V. fischeri* implica la interacción del autoinductor, químicamente caracterizado como 3-oxo-C<sub>6</sub>AHL (OHHL) y capaz de difundir libremente a través de la membrana, con una proteína reguladora, LuxR (Eberhard y col., 1981; Kaplan y Greenberg, 1985; Stevens y Greenberg, 1997). En el estado de vida libre *V. fischeri* sintetiza un nivel basal de OHHL, el que difunde a través de la membrana hacia el ambiente marino y por lo tanto sus concentraciones permanecen

bajas (Figura 3A). Cuando la bacteria entra en simbiosis con el calamar, la densidad poblacional comienza a aumentar dentro del órgano del animal y como consecuencia aumenta la concentración de OHHL (Figura 3B). Cuando la concentración del autoinductor alcanza un valor crítico, el cual corresponde a una determinada densidad celular o “quórum” de bacterias, OHHL se une a LuxR. Esta unión produce un cambio conformacional en LuxR tal que permite su interacción con una secuencia palindrómica de ADN, denominada “*lux box*” que se encuentra río arriba de los genes regulados por QS. La unión de LuxR al *lux box* recluta a la ARN polimerasa para la transcripción de *luxICDABEG*, lo que produce un aumento de OHHL, luciferasa y otras proteínas implicadas en la generación de bioluminiscencia. El aumento de autoinductor asegura que continúe la generación de bioluminiscencia y se retroalimente su propia síntesis.

El sistema de QS regula la expresión de una gran cantidad de factores de virulencia en bacterias Gram-negativas (Parker y Sperandio, 2009). Estudios realizados en nuestro grupo mostraron el perfil de AHL producido por 43 cepas nosocomiales y ambientales de *Acinetobacter* (González y col., 2009). Además, se demostró que *A. baumannii* M2 produce principalmente 3-OH-C<sub>12</sub>AHL como autoinductor, el cual está codificado por el gene *abaI* y está implicado en la formación de biofilm sobre superficies abióticas (Niu y col., 2008). Debido a que el QS podría ser un mecanismo central de regulación de la expresión de diferentes factores de virulencia en este patógeno oportunista, este proceso debe ser estudiado a fin de generar herramientas para futuras aplicaciones clínicas.

### **3.4. Polisacáridos capsulares**

Si bien los polisacáridos de la cápsula no han sido muy estudiados, un trabajo reciente demostró que dos genes implicados en el ensamblado y polimerización de la cápsula, eran esenciales para el crecimiento de *A. baumannii* en fluido de ascítico y exudado inflamatorio (Russo y col., 2010). Mediante mutagénesis al azar por transposición se demostró que la cápsula era necesaria para el crecimiento en fluido ascítico y suero humano, ambos conteniendo al sistema de complemento intacto como elemento de defensa del hospedador, y además era requisito para poder sobrevivir en un modelo de infección de tejido blando de rata. Estos resultados demostraron que la cápsula es una importante protección para este patógeno, por lo que los autores sugieren que las proteínas codificadas por estos genes (PTK y EPSA) poseen los requisitos necesarios para ser utilizados como blanco de drogas.



### 3.5. Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) han sido descritos como participantes en la evasión bacteriana de la respuesta inmune innata y adquirida del hospedador, con la generación de una respuesta inflamatoria del huésped que se correlaciona significativamente con la morbilidad y la mortalidad de los pacientes infectados (Pier, 2007). Estudios recientes en *A. baumannii* demostraron que una cepa mutada en el gen *lpsB*, el cual codifica para una glicosil transferasa (LpsB) involucrada en la síntesis de LPS, posee mayor sensibilidad a la actividad bactericida del suero en comparación con la cepa salvaje (Luke y col., 2010). Además, LpsB se encuentra altamente conservada en los aislamientos clínicos analizados. Este trabajo sugiere que los LPS cumplen un rol en la patogénesis de *A. baumannii* y que mutantes deficientes en LPS poseen una virulencia atenuada.

## 4. *Acinetobacter baylyi* ADP1

### 4.1. Origen de *A. baylyi* ADP1

*Acinetobacter* sp. ADP1 (previamente denominada *A. calcoaceticus* BD413) es una mutante microencapsulada que se obtuvo a partir de *A. calcoaceticus* BD4 por mutagénesis con luz UV (Juni y Janik, 1969). *Acinetobacter* sp. BD4 es una bacteria encapsulada aislada del suelo y debe su nombre a su capacidad de utilizar meso-2,3-butanodiol como única fuente de carbono. En 1969 Juni y Janik sometieron a esta cepa al tratamiento con luz UV de una lámpara germicida (100  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  durante 15-50 min) y seleccionaron las mutantes no encapsuladas en base a su morfología (colonias pequeñas, rugosas y secas) a fin de estudiar metabolitos implicados en la síntesis de la cápsula. Con el propósito de evidenciar la complementación por medio de intercambio de metabolitos, se co-cultivaron las mutantes no encapsuladas de a pares. Si la complementación por metabolitos hubiese sido la explicación para obtener células encapsuladas, se esperaba que la mitad de las células tuvieran cápsula. Sin embargo, el número de células encapsuladas resultó ser muy bajo con respecto a las no encapsuladas, por lo que se demostró que la difusión de metabolitos no podía explicar la síntesis de la cápsula y que debía haber ocurrido una recombinación genética entre las dos mutantes cuando fueron co-cultivadas. Esto fue corroborado cuando las mutantes no encapsuladas fueron aisladas y resultaron estables, sin revertir a la forma encapsulada. Este trabajo no sólo dió origen a la cepa BD413, sino que además demostró que esta cepa y su antecesora (BD4) eran competentes para la transformación natural, indicando que la ausencia de cápsula no es un

requisito para la transformación. La cepa BD413 posee una pequeña cápsula y fue seleccionada para posteriores trabajos, ya que no forma agregados al crecer en medio líquido.

#### **4.2. *A. baylyi* ADP1 como organismo modelo**

Un análisis genómico y fenotípico concluyó que *Acinetobacter* sp. ADP1 pertenece a la especie *Acinetobacter baylyi*, cuyos miembros poseen la capacidad de transformarse naturalmente (Vanechoutte y col., 2006). Esta característica distintiva de *A. baylyi* ADP1 de tomar ADN naturalmente, lo convierte en un organismo modelo para la manipulación genética. Además, *A. baylyi* ADP1 comparte con *E. coli* las características deseables para ser utilizado en el laboratorio: se lo encuentra en el suelo y agua, es aeróbico y protótrofo, es capaz de crecer en medios de cultivo ricos y mínimos, lentamente a temperatura ambiente y de manera óptima a 30°C y posee un genoma compacto y circular de 3.6 Mb completamente secuenciado (Barbe y col., 2004). Lo que hace que *A. baylyi* ADP1 sea aún más conveniente para la manipulación genética es que es naturalmente transformable, pudiéndose transformar con ADN doble o simple cadena, sólo siendo necesaria la inducción del estado competente mediante la dilución con medio fresco de un cultivo en estado estacionario (Palmen y col., 1993). Otra ventaja es la integración natural por recombinación homóloga, sin ser necesaria la adición de funciones recombinantes de otros organismos ni la inhibición de la actividad nucleasa, que en cambio son requeridas en el caso de *E. coli*. Se demostró también que *A. baylyi* ADP1 es un organismo versátil y flexible para ser sometido a diferentes estrategias de ingeniería genética basadas en PCR por solapamiento (Metzgar y col., 2004). Este procedimiento se emplea para:

- Obtención de mutantes delecionadas con marcador mediante el reemplazo del gen por un gen de resistencia.
- Obtención de mutantes delecionadas sin marcador mediante el uso de un marcador dual con selección positiva/negativa (por ejemplo, *Kan<sup>r</sup>/sacB*).
- Obtención de mutante con múltiple genes delecionados mediante el uso repetido del procedimiento para generar deleciones simples sin marcador.
- Agregado de etiquetas (por ejemplo, 6-His) mediante el reemplazo del codón stop del gen blanco por la secuencia correspondiente a la etiqueta seguida del codón stop.

Estas características particulares de *A. baylyi* ADP1 hicieron que esta cepa sea elegida para el estudio de sus dominios fotorreceptores.

### 4.3. Apéndices celulares de *A. baylyi* ADP1

En la superficie celular externa de las bacterias pueden encontrarse apéndices no flagelares. Si bien a lo largo del tiempo han sido llamados de manera variada y confusa (cilia, filamento, fimbria, *pili* o aguja), en la actualidad se los llama *pili* (del latín: pelo) o fimbria. Presentes tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, los *pili* participan en muchos procesos como son la conjugación, secreción, adhesión e invasión, formación de biofilm, motilidad celular y transporte de ADN (Fronzes y col., 2008). En bacterias Gram-negativas los apéndices son clasificados de acuerdo a su sistema de biosíntesis en cinco clases: *pili chaperona-usher* (CU o *pili* tipo I), *pili* tipo IV, *curli*, *pili* del sistema de secreción tipo III y *pili* del sistema de secreción tipo IV.

*A. baylyi* ADP1 posee dos tipos de *pili*: *pili* fino (2-3 nm de diámetro), el cual corresponde al *pili* tipo I y está implicado en la adhesión a superficies bióticas y abióticas (Gohl y col., 2006) y *pili* grueso polar (6 nm de diámetro), correspondiente al *pili* tipo IV, el cual está implicado en *twitching motility* (Henrichsen y Blom, 1975).

#### 4.3.1. Biofilm en *A. baylyi* ADP1

Gohl y col. estudiaron al *pili* tipo I de *A. baylyi* ADP1 y demostraron que su función está asociada a la adhesión a superficies bióticas y abióticas, y no participa en la motilidad en superficies sólidas (Gohl y col., 2006). Los *pili* fueron purificados y analizados estructuralmente por microscopía electrónica, lo que reveló que cada *pili* individual posee 2-3 nm de diámetro y se juntan para formar atados de al menos dos *pili* individuales, con una torsión hacia la derecha. Se describió a la proteína AcuA como la principal constituyente del *pili* y la mutación en el gen que la codifica (*acuA*) produce una cepa carente de *pili* fino y como consecuencia sin capacidad de adherirse a superficies bióticas y abióticas.

AcuA del *pili* fino de *A. baylyi* ADP1 mostró una alta similitud con los residuos N-terminal y C-terminal del *pili* F17 de *Escherichia coli*, lo cual sugería que AcuA tenía un plegado y ensamblado similar a las subunidades del *pili* F17, las cuales se ensamblan vía *chaperona-usher*. El análisis del locus *acuA* y los genes vecinos permitió evidenciar que la organización del operón *acu* corresponde a la organización del *pili* F17 y por lo tanto el *pili* fino de *A. baylyi* ADP1 es un *pili chaperona-usher* o

*pili* tipo I (Figura 4). El sistema del *pili chaperona-usher* de *A. baumannii* 19606 muestra una organización similar a la de *pili* F17 de *E. coli*. La comparación con la organización del sistema del *pili* de *A. baylyi* ADP1 con el de *A. baumannii* mostró cierta analogía, pero al comparar las subunidades principales (AcuA y CsuB) estas no presentaron similitud. Estos resultados permitieron concluir que los sistemas de *pili* fino de *A. baylyi* ADP1 y *A. baumannii* son significativamente diferentes (Gohl y col., 2006).

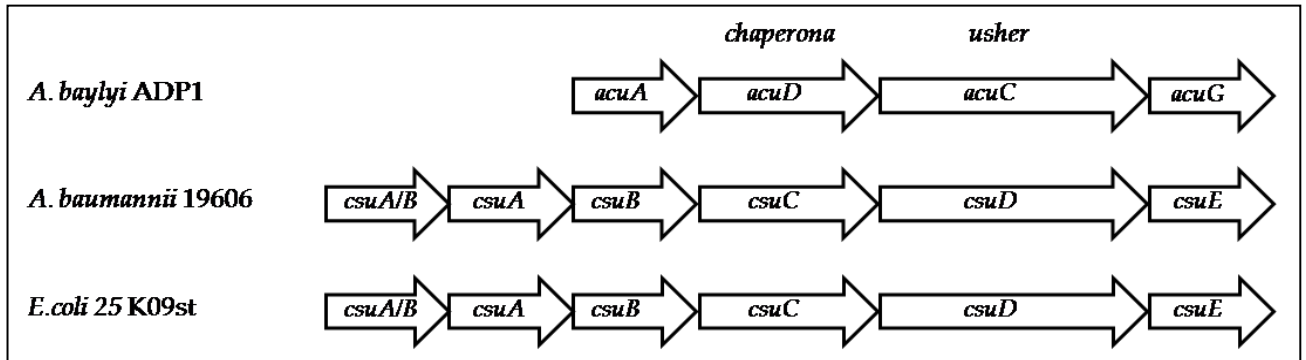


Figura 4. Alineamiento de ORF tipo *csu* en los genomas de *A. baylyi* ADP1, *A. baumannii* 19606 y *E. coli*. Adaptación de Gohl y col., 2006; y Tomaras y col., 2003.

#### 4.3.2. Twitching motility

A pesar que los miembros del género *Acinetobacter* (del griego "Akineto": "sin motilidad") han sido considerados como bacterias no móviles, en 1961 Lautrop introdujo el término "*twitching motility*" para describir un movimiento superficial independiente de flagelo que observó en *Acinetobacter calcoaceticus* (Lautrop, 1961). Luego, Henrichsen caracterizó a *twitching motility* como un movimiento intermitente de sacudida, donde las células se mueven en forma individual, aunque también se observa un movimiento de pequeños agregados celulares (Henrichsen, 1972). El mecanismo mediante el cual se llevaba a cabo este movimiento no se conoció hasta 1980, cuando Bradley propuso que la retracción de un *pili* polar producía la fuerza propulsora para el movimiento (Bradley, 1980). Este argumento está basado en ensayos realizados con fagos que se unen específicamente al *pili* de *Pseudomonas aeruginosa*. Mediante microscopía electrónica se observó que las células infectadas tenían partículas de fago en su superficie, mientras que mutantes carentes de *pili* (*pil*<sup>-</sup>) o *hiperpiladas* eran resistentes al fago. Si bien se esperaba resistencia por parte de las mutantes *pil*<sup>-</sup>, debido a la imposibilidad de adsorber el fago, las mutantes *hiperpiladas* mostraron partículas de fago a lo largo del *pili* y fue raro encontrarlas en la superficie celular. Para explicar que los fagos podían alcanzar la superficie de las células de la cepa salvaje y

no lo hacían en el caso de las mutantes *hiperpiladas*, Bradley propuso que las partículas de fago se unían al *pili* en alguna posición y por retracción del mismo llegaban a la superficie celular. Luego, el *pili* polar se denominó *pili* tipo IV y estudios posteriores en *Neisseria gonorrhoeae* (Merz y col., 2000), *Pseudomonas aeruginosa* (Skerker y col., 2001) y *Myxococcus xanthus* (Sun y col., 2000) confirmaron que el “*twitching*” es un tipo especial de movimiento que se produce debido a ciclos de extensión, adhesión y retracción del *pili* tipo IV. Es importante aclarar que para *M. xanthus* este movimiento se denomina “*social gliding*”.

Una gran variedad de factores ambientales afectan la motilidad tipo *twitching*, pero en la mayor parte de los casos el mecanismo de acción permanece desconocido. Hay evidencias de la influencia de ciertos componentes del medio de cultivo sobre el *twitching*, como es el caso del hierro, fosfato inorgánico, triptona, mucina y BSA en *P. aeruginosa* (Rashid y Kornberg, 2000; Huang y col., 2003) como también de fosfatidieletanolamina, el primer lípido reconocido como quimioattractante en *P. aeruginosa* (Miller y col., 2008) y *M. xanthus* (Kearns y Shimkets, 2001). Dado que la motilidad tipo *twitching* es también una respuesta grupal que generalmente implica contacto célula-célula, se propuso que la densidad celular podría tener participación en este movimiento. Esta hipótesis fue explorada en *P. aeruginosa*, en donde se han estudiado las respuestas de mutantes en el sistema de QS. Sin embargo la participación del sistema de QS en el control del *twitching* en *P. aeruginosa* ha mostrado resultados contradictorios (Glessner y col., 1999; Beatson y col., 2002; Patriquin y col., 2008). Otro factor ambiental importante es la luz, la cual mostró un control del movimiento y la producción de *pili* tipo IV en *Synechocystis* PCC6803 (Bhaya y col., 2001). Estudios realizados mientras este trabajo de tesis se llevaba a cabo demostraron que la luz inhibía el movimiento en *A. baumannii* ATCC 17978 (Mussi y col., 2010) y que esta motilidad era dependiente del sistema de QS en *A. baumannii* M2 (Clemmer y col., 2011).

## **5. Aplicaciones ambientales y biotecnológicas de *Acinetobacter***

Miembros del género *Acinetobacter* poseen características que los hacen atractivos en cuanto a posibles aplicaciones ambientales y biotecnológicas. Así por ejemplo, algunas cepas son capaces de degradar una serie de importantes contaminantes ambientales y pueden ser utilizados como biocatalizadores. Además, cepas del género pueden producir una variedad de productos intra y extracelulares de interés comercial (Abdel-El-Haleem, 2003).

## 5.1. Biorremediación de contaminantes

La biorremediación es una tecnología eficaz, económica y muy prometedora utilizada para limpiar suelos y aguas residuales que contienen contaminantes orgánicos o inorgánicos. Miembros del género *Acinetobacter* son capaces de degradar y remover contaminantes del tipo xenobióticos y recalcitrantes, compuestos halógenados, fosfato biológico/polifosfatos, metales pesados y aceites. Distintas cepas de *Acinetobacter* pueden degradar xenobióticos y recalcitrantes como fenol (Briganti y col., 1997), tolueno (Spain y col., 2003), 4-hidroxibenzoato (Allende y col., 2000), ácido benzoico y p-hidroxibenzoico (Delneri y col., 1995), ácidos 4-hidroximandelico y 4-hidroxi-3-metoximandelico (Sze y Dagley, 1987). Además, son capaces de degradar compuestos halogenados, como ser bifenilos policlorados (Furukawa, 1979) y remover fosfato biológico y metales pesados de aguas residuales (Fuhs y col., 1975; Boswell y col., 1999).

Los suelos contaminados con aceites, lubricantes y diésel contienen agentes carcinogénicos y potentes inmunotóxicos (Propst y col., 1999). Se han caracterizado cepas de *Acinetobacter* capaces de usar el diésel obtenido por petroquímica como única fuente de carbono y energía, mejorando la remediación de estos ambientes (Mara y col., 2012).

## 5.2. Bioproductos

### 5.2.1. Bioemulsificantes

Los bioemulsificantes son importantes productos microbianos con propiedades que permiten su utilización en la industria alimenticia, agroquímica, cosmética y farmacéutica. La ausencia de toxicidad, la capacidad de biodegradarse y su especificidad, hacen que estos productos sean atractivos para la industria y aceptados por el medio ambiente (Gautam y Tyagi, 2006). Muchos organismos son capaces de vivir en ambientes contaminados debido a que secretan bioemulsificantes que les permiten incorporar dichos sustratos insolubles mediante el contacto directo o pseudosolubilización. Los bioemulsificantes son clasificados en dos grupos: (i) moléculas de bajo peso molecular, anfipáticas, como glicolípidos, ácidos grasos y fosfolípidos; (ii) bioemulsificantes poliméricos, como los polisacáridos con propiedades emulsificantes de *Acinetobacter*, siendo los más estudiados los producidos por *A. calcoaceticus* RAG-1 (Rosenberg y col., 1979), *A. calcoaceticus* BD4 y BD413 (Kaplan y col., 1987). *A. calcoaceticus* RAG-1 fue caracterizada por su crecimiento en hidrocarburos y por la producción de emulsán, un

heteropolisacárido formado por monómeros de D-galactosamina, un ácido amino urónico y un azúcar. La cepa encapsulada *A. calcoaceticus* BD4 y su mutante microencapsulada *A. calcoaceticus* BD413 (actualmente denominada *A. baylyi* ADP1) producen polisacáridos extracelulares, además de su material capsular (Kaplan y Rosenberg, 1982). La cápsula está compuesta por L-ramnosa y D-glucosa, en una relación 4:1 para *A. calcoaceticus* BD4; y 3:1 para *A. calcoaceticus* BD413. Debido a que la composición de los polisacáridos extracelulares y los de la cápsula es la misma y que la actividad emulsificante sólo está presente en los primeros, se propuso que la actividad bioemulsificante de *A. calcoaceticus* BD4 y BD413 era debida a la formación de un complejo formado por exopolisacáridos y proteínas específicas no unidas covalentemente (Kaplan y col., 1987). Se demostró que dependiendo del medio de cultivo entre el 32% y 63% de los polisacáridos producidos por *A. calcoaceticus* BD413 son extracelulares, mientras que la cepa BD4 sólo secreta entre 7% y 14% del total de polisacáridos producidos (Kaplan y Rosenberg, 1982). Esto podría explicar la mayor actividad bioemulsificante de *A. calcoaceticus* BD413 con respecto a BD4.

### **5.2.2. Lipasas**

Las lipasas son carboxilesterasas que catalizan tanto la hidrólisis como la síntesis de acil glicerol de cadena larga. Las lipasas microbianas presentan múltiples aplicaciones biotecnológicas, ya que son biocatalizadores que actúan en condiciones extremadamente suaves, son estables en solventes orgánicos, tienen baja especificidad de sustrato y poseen alta enantioselectividad (Jaeger y Eggert, 2002). En particular, las lipasas bacterianas extracelulares son utilizadas en la industria alimenticia, en la producción de detergentes, cosméticos e industria farmacéutica, como también en las síntesis orgánicas y en la degradación de grasas y aceites (Jaeger y col., 1994). Dentro del género *Acinetobacter*, se han caracterizado las lipasas de *A. radioresistens* (Shen y col., 1999) y de *A. baylyi* ADP1 (Kok y col., 1995).

### **5.2.3. Triacilglicerol y ésteres de cera**

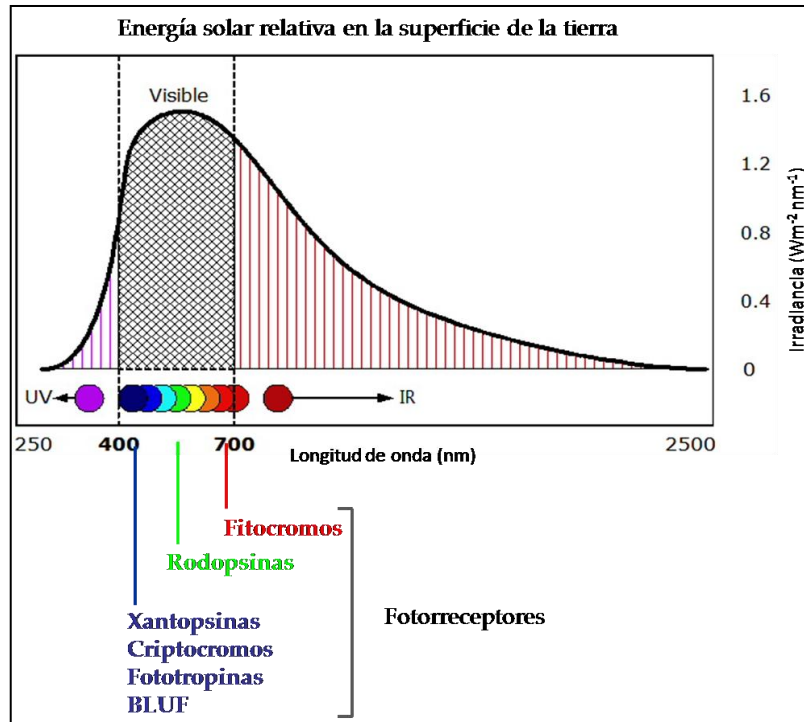
Los triacilglicerol (TAG) y los ésteres de cera (WE) son lípidos neutros empleados como diluyentes y lubricantes en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica. Recientemente, mediante el noqueado de genes codificantes para enzimas responsables de la degradación de TAG de *A. baylyi* ADP1 se obtuvieron cepas capaces de producir mayores cantidades de este lípido (Santala y col., 2011). Por otro lado, el interés de la industria cosmética en los WE presentes en el aceite de

jojoba llevó a querer producir WE similares a bajos costos y en gran escala. Para ello, se realizó el clonado de la secuencia codificante de la sintasa de WE (WS) proveniente de las semillas de jojoba y posterior expresión heteróloga en *E. coli* y *S. cerevisiae*, pero se obtuvieron enzimas sin actividad (Lardizaba y col., 2000). Por otro lado, estudios realizados en *A. baylyi* ADP1 permitieron identificar una enzima implicada en los pasos finales de la biosíntesis de TAG y WE, WE sintasa/acil-CoA: diacilglicerol aciltransferasa (WS/DGAT). Esta enzima bifuncional resultó activa al ser expresada heterológicamente en *E. coli* S17-1 y *Pseudomonas citronellolis* y además mostró potencial para la producción de WE similares a los del aceite de jojoba (Kalscheuer y Steinbuchel, 2003). Además, WS/DGAT fue utilizada en un sistema destinado a la producción de biodiésel que consiste en una cepa de *E. coli* conteniendo al plásmido p(Microdiesel), con los genes codificantes para piruvato decarboxilasa de *Zymomonas mobilis* y para WS/DEGAT de *A. baylyi* ADP1 (Kalscheuer y col., 2006). Recientemente, la producción de etil ésteres de ácidos grasos (FAEE) utilizando este sistema se realizó en escala piloto (Elbahloul y Steinbuchel, 2010).

## 6. Fotorreceptores

La radiación solar presenta un espectro de energías que van desde los rayos X a las ondas de radio. Sin embargo, sólo alcanzan la tierra aquellas energías comprendidas desde la región del UV al IR. Los organismos han desarrollado sistemas fotosensores, en particular proteínas fotorreceptoras, a fin de poder percibir y responder a la luz en las regiones del visible e IR. Debido a que las proteínas no son capaces de absorber la luz, los fotorreceptores adquieren esta capacidad mediante la unión a un cromóforo. Los cromóforos (del griego cromos: color) son responsable del color del fotorreceptor ya que son capaces de absorber determinadas longitudes de onda y transmitir o reflejar otras. Así, los fitocromos absorben en el rojo y rojo lejano (780 nm), las rodopsinas absorben en el verde y las xantopsinas, criptocromos, fototropinas y proteínas conteniendo flavinas sensibles a la luz azul (*blue light sensing using flavin* o BLUF) absorben en la región azul del espectro (Figura 5).



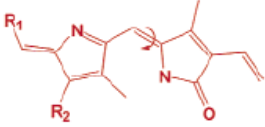
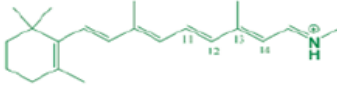
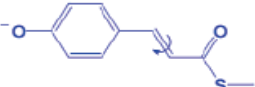
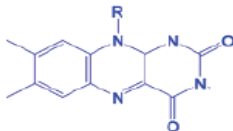


**Figura 5. La luz y los fotorreceptores.** Espectro de la radiación solar que alcanza la tierra y las longitudes de onda a la que absorben los distintos fotorreceptores en función del cromóforo que poseen.

### 6.1. Clasificación de fotorreceptores

De acuerdo a la estructura química de sus grupos cromóforos, los fotorreceptores se clasifican en seis familias: fitocromos, rodopsinas, xantopsinas, criptocromos, fototropinas y las proteínas BLUF. La fotoquímica de la activación de estas proteínas produce una modificación en la configuración del cromóforo. Mientras que en las primeras tres familias se produce una isomerización *cis-trans* de fitocromobilina, retinal o ácido p-cumárico, en las últimas tres las proteínas poseen un cromóforo de flavina, en el que la isomerización no es posible, por lo que se sugirieron otros modos de activación (Tabla 3).

**Tabla 3. Familias de fotorreceptores**

| CROMÓFOROS    |                  | Estructura  | FAMILIA FOTORRECEPTOR     | FOTOQUÍMICA                    |
|---------------|------------------|---|---------------------------|--------------------------------|
| Clases        | Ejemplo          |   |                           |                                |
| tetrapirroles | fitocromobilina  |  | <b>Fitocromos</b>         | <i>cis</i> ↔ <i>trans</i>      |
| polienos      | Retinal          |  | <b>Rodopsinas</b>         | <i>cis</i> ↔ <i>trans</i>      |
| aromáticos    | ácido p-cumárico |  | <b>Xantopsinas (PYP)</b>  | <i>cis</i> ↔ <i>trans</i>      |
|               | Flavina          |  | <b>Criptocromos</b>       | Transferencia e <sup>-</sup> ? |
|               |                  |   | <b>Fototropinas (LOV)</b> | Aducto de Cys                  |
|               |                  |   | <b>BLUF</b>               | Transferencia H <sup>+</sup> ? |

e<sup>-</sup>: electrones. Cys: cisteína. H<sup>+</sup>: protones. Adaptado de van der Horst y Hellingwerf, 2004.

### 6.1.1. Fitocromos

Los fitocromos fueron descubiertos en plantas superiores hace más de 50 años como responsables de la regulación de la floración y el ritmo circadiano (Butler y col., 1959). Actualmente, se sabe que estos fotorreceptores además participan en otras respuestas, como el movimiento de cloroplastos, motilidad citoplasmática, germinación y síntesis de clorofila, y deben su función a la unión covalente de la proteína con un cromóforo de bilina (fitocromobilina, ficocianobilina o biliverdina), con una absorción máxima en la región rojo/rojo lejano del espectro (Mathews, 2006). Cuando la luz roja incide en el fotorreceptor, este estímulo dispara la isomerización del cromóforo de su forma “todo-cis” de Pr (estado basal del fitocromo) a la forma “todo-trans” de Pfr, la cual absorbe al rojo lejano. Pfr vuelve lentamente a su estado basal (Pr) en oscuridad, pero puede reconvertirse rápidamente si es iluminado por luz del rojo lejano.

Investigaciones realizadas en los últimos 15 años permitieron evidenciar la existencia de fitocromos en bacterias y hongos (Schmitz y col., 2000, Davis y col., 1999; Lamparter y col., 2002; Froehlich y col., 2005). Los fitocromos de plantas y cianobacterias utilizan como cromóforo fitocromobilina y ficocianobilina, respectivamente, mientras que los fitocromos de proteobacterias y hongos unen biliverdina (Rockwell y Lagarias, 2006). A pesar de que la función fisiológica de los fitocromos de plantas ha sido bien caracterizada, pocos son los casos en lo que se ha evidenciado la función de

estos fotorreceptores en otros organismos, como por ejemplo la participación del fitocromo en la regulación de la fotosíntesis en *Rhodospseudomonas palustris* (Giraud y col., 2004)

### 6.1.2. Rodopsinas

Las rodopsinas constituyen la familia de fotorreceptores mejor caracterizada. Su estructura consiste en un cromóforo (retinal) unido a una proteína integral de siete fragmentos transmembrana (opsina). Estos fotorreceptores fueron descritos en muchas especies de bacterias, algas y animales, pero hasta el momento no se han encontrado en plantas superiores.

Las rodopsinas pueden pertenecer a dos tipos de familias: las rodopsinas visuales, las cuales se encuentran en los ojos de los animales y las rodopsinas de arqueas, las cuales se encuentran en organismos halófilos extremos y funcionan como bomba de protones (bacteriorodopsinas, BR), bombas de ión cloruro (halorodopsinas, HR) o rodopsinas sensoras (SR) (Bryl, 2003). La luz produce una isomerización del cromóforo de 11-*cis* retinal a todo-*trans* retinal en las rodopsinas visuales, mientras que en las rodopsinas de arqueas la isomerización es de todo-*trans* retinal a 13-*cis* retinal (Spudich y col., 2000). En los últimos años nuevos descubrimientos demostraron que las rodopsinas de arqueas se extendían por fuera de este dominio. Dos rodopsinas tipo arquea fueron descritas como receptores de fototaxis en el alga *Chlamydomonas reinhardtii* y se demostró que poseían actividad de canal de protones, por lo que se denominaron rodopsinas de canal (Sineshchekov y col., 2002). Es preciso aclarar debido a la confusa nomenclatura que las BR no son rodopsinas bacterianas, sino que pertenecen a las arqueas y la primer descripción de rodopsinas bacterianas fue en el año 2000, cuando este fotorreceptor se identificó en un miembro no cultivable de las *Gammaproteobacterias* marinas (Beja y col., 2000). A las rodopsinas que funcionan como bombas de protones estimuladas por luz en organismos procariotas se las denominó proteorodopsinas. También se describieron SR en microorganismos eucariotas, cianobacterias y en la retina de los vertebrados (melanopsinas) (Bieszke y col., 1999; Jung y col., 2003; Provencio y col., 1998).

### 6.1.3. Xantopsinas

Las xantopsinas son fotorreceptores que poseen su cromóforo (*trans* ácido p-cumárico) unido covalentemente por un enlace tioéster. Esta familia se encuentra menos distribuída que las otras familias, encontrándose únicamente en el filo *Proteobacteria*. El arqueotipo de esta familia es la *Photoactive Yellow Protein* (PYP) de *Ectothiorhodospira halophila* (Meyer y col., 1987). PYP se ha

convertido en el prototipo del dominio PAS, con seis hojas plegadas  $\beta$  centrales y cinco  $\alpha$ -hélices en ambos lados (Cusanovich y Meyer, 2003). Las siglas PAS proviene de las tres proteínas en donde el plegamiento PAS fue originalmente encontrado: *Periodic Clock Protein* (PER) de *Drosophila*, *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator* (ARNT) de vertebrados y *Single-minded Protein* de *Drosophila* (SIM). El dominio PAS es generalmente encontrado como parte de una proteína con múltiples dominios, pero la estructura de PYP es esencialmente un dominio PAS junto a una región N-terminal de 1 a 25 aminoácidos.

Si bien PYP ha sido muy bien caracterizada en cuanto a su estructura y fotoquímica, en pocos casos este fotorreceptor fue asociado a una función fisiológica. *E. halophila* mostró una fototaxis negativa al ser iluminado con luz azul (Sprenger y col., 1993), pero el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo esta respuesta es aún desconocido. La proteína de fusión Ppr (PYP-fitocromo) de *Rhodospirillum rubrum*, que regula la expresión del gen chalcone sintasa en respuesta a la luz azul, fue la primer xantopsina cuya función biológica fue genéticamente demostrada (Jiang y col., 1999).

#### **6.1.4. Criptocromos**

Los primeros fotorreceptores conteniendo flavina identificados pertenecían a la familia de los criptocromos, la cual recibió este nombre debido a la característica de tener su cromóforo escondido (del griego: "color oculto"). Actualmente se conoce la amplia distribución de estos fotorreceptores encontrándose en eucariotas inferiores y superiores, como algas, plantas, insectos y animales, como también en procariotas. Dentro de los procesos en los que participan se encuentra el crecimiento y el desarrollo de plantas (Ahmad y Cashmore, 1996), la sincronización del ritmo circadiano en plantas, insectos y mamíferos (Cashmore, 2003; Emery y col., 1998; Griffin y col., 1999) y la orientación magnética de las aves durante la migración (Moller y col., 2004; Heyers y col., 2007).

Debido a la gran similitud de secuencia entre los criptocromos y las fotoliasas, ambos se agrupan en una única superfamilia denominada fotoliasa/criptocromo. Las fotoliasas son enzimas encargadas de la reparación del daño del ADN en respuesta a la luz azul. De acuerdo al daño que estas reparan se denominan CPDs a aquellas que reparan dímeros de ciclobutano pirimidina y 6-4 fotoliasas las que reparan los fotoproductos 6-4 pirimidina pirimidona (Kanai y col., 1997). Si bien miembros de las arqueas poseen fotoliasa CPDs, no se han encontrado criptocromos en este

dominio. Los criptocromos de una gran variedad de organismos han sido agrupados en tres subfamilias de acuerdo a la similitud de secuencia: criptocromos de plantas, criptocromos de animales y proteínas criptocromo-DASH. Mientras que las dos primeras carecen de actividad reparadora de ADN, la misma está presente en el caso de CRY-DASH, los cuales funcionan como CPDs. Esta subfamilia fue inicialmente encontrada en cianobacteria (*Synechocystis*) y a pesar de que no fue encontrada ni en *Drosophila* ni en humanos, debe su nombre a su relación con los criptocromos encontrados en *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* y Homo (Brudler y col., 2003). Las proteínas CRY-DASH han sido también identificadas en bacterias no fotosintéticas, hongos, plantas y animales, pero su función biológica es aún desconocida (Lin y Todo, 2005).

La estructura de los criptocromos, a excepción de las proteínas CRY-DASH, consiste en dos dominios, un dominio N-terminal relacionado con fotoliasa (PHR) y un dominio C-terminal. La región PHR une dos cromóforos, un FAD y una pteridina. Las fotoliasas también unen FAD, pero el segundo cromóforo puede ser una pteridina o una deazaflavina. El dominio C-terminal es variable, estando ausente en las proteínas CRY-DASH y siendo más largos en los criptocromos animales (Lin y Todo, 2005). Teniendo en cuenta que ni la pterina ni la flavina son capaces de realizar una isomerización *cis/trans*, se espera una fotoquímica diferente para esta familia de fotorreceptores. Si bien han aparecido diferentes propuestas y se demostró que la activación de los criptocromos está basada en la transferencia reversible de electrones, el mecanismo del fotociclo sigue en discusión (Lin, 2002; Galland y col. 2003; Liu y col., 2010).

### **6.1.5. Fototropinas: dominios LOV**

En el siglo XIX Charles Darwin y su hijo notaron que varias especies de plantas mostraban fototropismo: un crecimiento dependiente de la luz direccionado hacia la fuente luminosa (Darwin y Darwin, 1880). Sin embargo, no se conoció el fotorreceptor responsable de dichas respuestas hasta 1997, cuando se describió por primera vez una proteína denominada fototropina en *Arabidopsis thaliana* (Huala y col., 1997). Dentro de las respuestas mediadas por fototropinas en plantas se encuentran el fototropismo, el movimiento de cloroplastos y la apertura de los estomas (Christie y col., 2002).

El dominio conservado en las fototropinas es el dominio LOV, el cual corresponde a un subgrupo de los dominios PAS y debe su nombre a su capacidad de regular señales externas tales como luz, oxígeno y voltaje. Las fototropinas son proteínas que poseen dos dominios N-terminal fotoactivos

LOV (LOV1 y LOV2) y un dominio C-terminal con actividad serin/treonin quinasa. Los dominios LOV utilizan un derivado de la flavina (FMN) como cromóforo. Además de formar parte de las fototropinas, los dominios LOV pueden formar parte de proteínas junto a una gran variedad de dominios efectores, tales como quinasas, dominios de unión a ADN, dominios STAS, entre otros (Swartz y col., 2007; Ballario y col., 1996; Ávila-Pérez y col., 2006). También se han identificado proteínas conteniendo únicamente un dominio LOV junto a una extensión en la región N- o C-terminal, sin dominios efectores conocidos, en bacterias y hongos (Jentsch y col., 2009; Schwerdtfeger y Linden 2003). En términos generales hablaremos de proteínas LOV, refiriéndonos tanto a las proteínas que sólo consisten en un dominio LOV, como aquellas que poseen el dominio LOV junto a el o los dominio/s efector/es.

#### 6.1.6. Proteínas BLUF

En 1992 estudios realizados por Shimada y col. demostraron que la luz azul producía la represión de genes de la fotosíntesis en *Rhodobacter sphaeroides* (Shimada y col., 1992). Diez años después se pudo identificar a la proteína AppA como el fotorreceptor responsable de esta respuesta (Masuda y Bauer, 2002; Braatsch y col., 2002). El estudio de la región N-terminal de esta proteína permitió descubrir un nuevo dominio con unión a FAD, al cual se lo denominó BLUF por *blue light sensing using flavin* (Gomelsky y Klug, 2002). Además, el análisis bioinformático no sólo permitió evidenciar que los dominios BLUF se encuentran formando parte de proteínas de organismos pertenecientes al dominio Bacteria y Eucariota, sino que

también permitió agrupar a las proteínas BLUF en dos categorías: las proteínas “complejas”, que comprenden proteínas con múltiples dominios, y las proteínas “cortas”, compuestas sólo por un dominio BLUF más 30-70 aminoácidos adicionales (Gomelsky y Klug, 2002). En términos generales hablaremos de proteínas BLUF, refiriéndonos tanto a proteínas cortas como complejas. Los dominios BLUF muestran un plegamiento tipo ferredoxina el cual consiste en cinco hojas plegadas  $\beta$  con dos  $\alpha$  hélices empaquetadas en un lado (Figura 6). El anillo isoaloxacínico del cromóforo FAD se encuentra

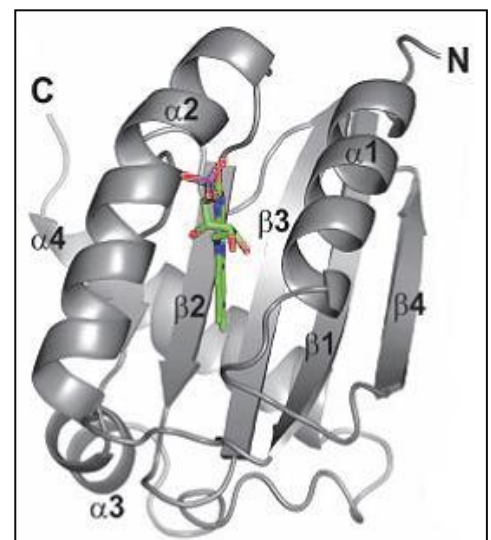
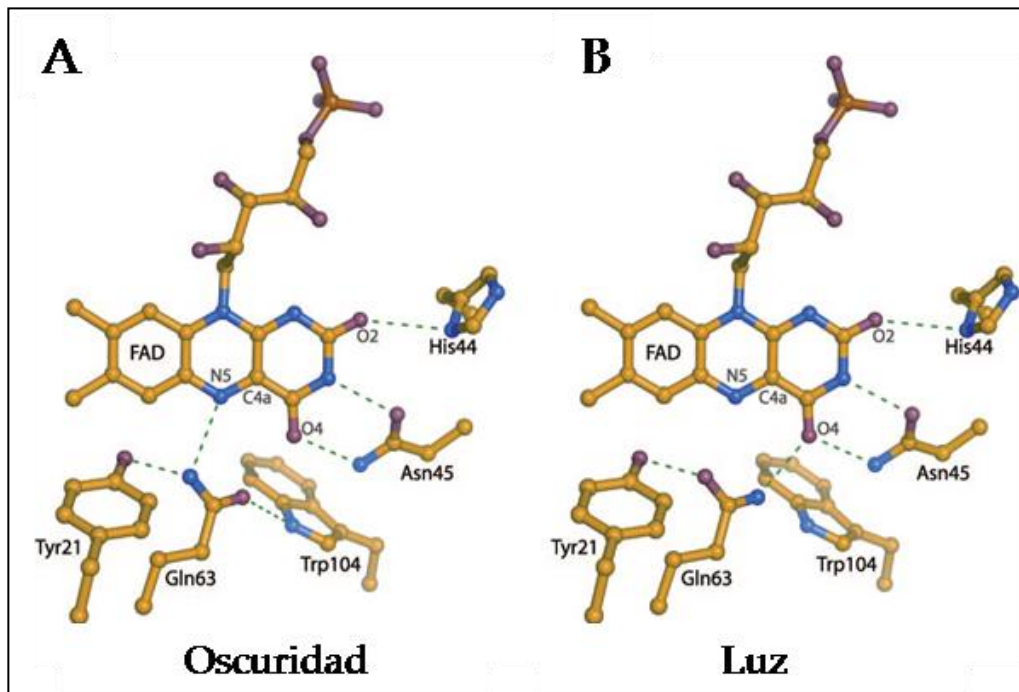


Figura 6. Estructura del dominio BLUF correspondiente a BlrB de *Rhodobacter sphaeroides* (Jung y col., 2005).

posicionado entre las dos  $\alpha$  hélices. La estructura secundaria de los dominios BLUF difiere de los otros plegamientos descritos para proteínas con unión a flavina. El bolsillo proteico donde se une el cromóforo FAD en el BLUF de AppA de *R. sphaeroides* se representa en la Figura 7. El cromóforo se encuentra rodeado de una gran cantidad de puentes de hidrógeno que permiten su unión a la proteína, dentro de los aminoácidos que participan en esta unión se encuentran la tirosina (Tyr) y glutamina (Gln) los cuales están altamente conservados. Bajo la iluminación con luz azul, los dominios BLUF muestran un corrimiento de  $\sim 10$  nm hacia el rojo en el espectro de absorción, lo cual es característico de esta familia de fotorreceptores y es considerado el estado de señalización (Masuda y Bauer, 2002). Si bien la transferencia intramolecular de protones y/o electrones en las uniones de hidrógeno ha sido sugerida como responsables del corrimiento hacia el rojo, el mecanismo del fotociclo no es completamente conocido. La luz azul produce un estado excitado de FAD, el que luego obtiene un electrón de la tirosina conservada formando una semiquinona aniónica de FAD ( $\text{FAD}^{\cdot-}$ ) (Laan y col., 2003). Los procesos químicos que continúan el fotociclo están en discusión y hay dos modelos propuestos: un giro de  $180^\circ$  de la cadena lateral de Gln (Anderson y col., 2005; Gauden y col., 2006) (Figura 7) y la tautomerización de este aminoácido (Domratcheva y col., 2008, Sadeghian y col., 2008, Khrenova y col., 2013).



**Figura 7.** Estructura de rayos X del dominio BLUF de AppA de *R. sphaeroides*. Vecindad del cromóforo FAD en oscuridad (A) y luz (B). Se muestran las orientaciones de Gln con giro de  $180^\circ$ . (Gauden y col., 2006).

Los dominios BLUF han sido descritos como responsables en la regulación de diferentes respuestas a la luz azul, entre estas se encuentre la regulación de la expresión de genes de la fotosíntesis en *R. sphaeroides* (Masuda y Bauer, 2002), la motilidad en *Euglena gracilis* (Ntefidou y col., 2003) y *Synechocystis* sp. (Okajima y col., 2005), la formación de biofilm en *Escherichia coli* (Tschowri y col., 2009) y *Rhodopseudomonas palustris* (Kanazawa y col., 2010), la formación de biofilm, motilidad y virulencia en *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 (Mussi y col. 2010).

## 6.2. Procesos regulados por luz en bacterias quimiotróficas

En 1978 se mostró la primer respuesta fisiológica mediada por luz en bacterias quimiotróficas: la formación de cuerpos fructíferos en *Stigmatella aurantiaca* (Qualls y col., 1978). Si bien con la posterior secuenciación del genoma se comprobó que esta bacteria posee secuencias putativas para dos fitocromos y dos xantopsinas (van der Horst y Hellingwerf, 2007), la vía de transducción y regulación de la respuesta a la luz no ha sido totalmente dilucidada hasta el momento. En la actualidad se conocen varias respuestas celulares dependientes de la luz en bacterias quimiotróficas, como la formación de pigmentos carotenoides en *Bdellovibrio bacteriovorus* (Friedberg, 1977), los que pueden ejercer un efecto protector frente al daño fotooxidativo. Estudios en *Bacillus subtilis* demostraron que la luz azul desencadena una respuesta de estrés que involucra al factor Sigma B a través de su fotorreceptor YtvA, el cual está formado por un dominio LOV en la región N-terminal y un dominio STAS en la región C-terminal (Ávila-Pérez y col., 2006). Por otro lado, se evidenció que el fotorreceptor LOV-HK de *Caulobacter crescentrus* modula la adhesión a superficies en función de la luz azul a través de la interacción con un dominio regulador de respuesta (Purcell y col., 2007). Dentro del listado de bacterias quimiotróficas que poseían fotorreceptores se encontraron bacterias patógenas, algunas de las cuales fueron estudiadas en cuanto a su respuesta a la luz. En *E. coli* se demostró que la luz azul percibida por su fotorreceptor YcgF (BLUF-EAL) regula la formación de biofilm (Tschowri y col., 2009) y el estudio del fotorreceptor LOV-HK de *Brucella abortus*, evidenció que la luz azul aumenta la virulencia de este patógeno intracelular (Swartz y col., 2007). Además, se demostró que *Rhizobium leguminosarum* también posee un fotorreceptor LOV-HK el cual participa en la regulación de la nodulación, adhesión celular y producción de polisacáridos mediada por la luz azul (Bonomi y col., 2012). Por otro lado, se ha caracterizado a la proteína BLUF de *A. baumannii*, demostrándose que la luz azul inhibe la formación de biofilm y la motilidad, al mismo tiempo que aumenta su respuesta de virulencia (Mussi y col., 2010).



A diferencia de *A. baumannii*, que presenta una única secuencia codificante para BLUF (*blsA*), el genoma de *A. baylyi* ADP1 presenta cuatro secuencias putativas para proteínas BLUF. Por lo tanto, el estudio de estos fotorreceptores en *A. baylyi* ADP1 permitirá no sólo realizar una comparación entre una cepa ambiental y una patógena oportunista en cuanto a la diversidad de respuestas al estímulo luminoso, sino que además permitirá evaluar el significado de la abundancia de dichos genes.

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral es el estudio de posibles marcadores de virulencia en especies del género *Acinetobacter*, incluyendo al sistema de densidad poblacional y a los dominios fotorreceptores, a fin de establecer su relación con la respuesta de virulencia en este género.

Para cumplir con este objetivo se abordaron los siguientes aspectos:

- Análisis de marcadores fenotípicos relacionados con virulencia en cepas de importancia clínica de *Acinetobacter*
- Búsqueda de genes de densidad poblacional (*luxI* y *luxR*) y análisis filogenético de las correspondientes proteínas en cepas de importancia clínica de *Acinetobacter*
- Análisis de la distribución y organización de fotorreceptores con dominio BLUF en bacterias en general y en el género *Acinetobacter* en particular.
- Identificación de fenotipos con respuesta a la luz en *A. baylyi* ADP1
- Obtención de mutantes noqueadas en genes codificantes para proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 y su evaluación geno/fenotípica
- Complementación de cepas mutantes en genes codificantes para proteínas BLUF y su evaluación fenotípica
- Análisis de la expresión de los genes codificantes para proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 bajo condiciones de luz y oscuridad

# Capítulo 1

**Estudio de marcadores fenotípicos relacionados con virulencia  
en cepas de importancia clínica del género *Acinetobacter***

## INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Acinetobacter* han adquirido particular importancia en la clínica médica debido a su éxito en producir brotes intrahospitalarios y su rápido desarrollo de resistencia a todos los antibióticos convencionales (Bergogne-Berezin y Towner, 1996; Bonomo y Szabo, 2006; Joly-Guillou, 2005). Dentro de las especies de importancia clínica, existe una gran diversidad en cuanto a su patogenicidad. Mientras que los miembros del complejo Acb son considerados patógenos humanos, especies como *A. Iwoffii*, *A. junii* y *A. haemolyticus* raramente causan enfermedad y *A. johnsonii* y *A. radioresistens* sólo colonizan la piel (Peleg y col., 2008). Hasta el momento no se han demostrado cuales son las características que hacen que algunas especies del género *Acinetobacter* sean más eficientes que otras en cuanto al desarrollo de patogenicidad en humanos. Estudios realizados en *A. baumannii* demostraron que su capacidad de persistir en el ambiente hospitalario por largos períodos, sobreviviendo a la desecación, tratamientos antibióticos y baja disponibilidad de nutrientes, se debe a la formación de biofilm en superficies abióticas (Gaddy y Actis, 2009). Además, se ha demostrado que este fenómeno responde a una serie de factores de virulencia como son el sistema del *pili chaperona-usher* (Tomaras y col., 2003), el cual a su vez está regulado por el sistema BfmRS (Tomaras y col., 2008), y la proteína Bap (Loehfelm y col., 2008). Por otro lado, se demostró que la proteína OmpA es indispensable para la adhesión de *A. baumannii* a superficies bióticas y también induciría la apoptosis de las células del hospedador (Gaddy y col., 2009). Como se indicó anteriormente, *A. baumannii* ATCC 19606 produce y secreta sideróforos de tipo acinetobactina (Yamamoto y col., 1994). Esto permitiría el aumento en la formación de biofilm en ambientes con limitación de hierro, explicando tanto la persistencia de este patógeno en el ambiente hospitalario, como la regulación del biofilm en función de la disponibilidad de este nutriente (Tomaras y col., 2003). Por otro lado, estudios realizados en *A. baumannii* M2 demostraron que el sistema de QS regula la formación de biofilm (Niu y col., 2008).

Si bien los factores de virulencia de *A. baumannii* han sido ampliamente estudiados, poco se conoce sobre las otras especies del género. Considerando que el sistema de QS regula la expresión de varios factores de virulencia en bacterias Gram-negativas (Parker y col., 2009) y que un estudio realizado previamente en nuestro grupo de trabajo se identificó el patrón de las AHL en 43 cepas del género *Acinetobacter*, seleccionamos nueve cepas clínicamente relevantes y pertenecientes a distintas especies del género para realizar un análisis más detallado. Una primera evaluación de las cepas seleccionadas consistió en un análisis de los marcadores fenotípicos posiblemente

relacionados con virulencia. También, se realizó una nueva evaluación de las señales de QS utilizando un sistema de detección diferente y el análisis filogenético de los genes codificantes para la sintasa y regulador del sistema de QS (*luxI* y *luxR*). Nuestro trabajo permitió ampliar el conocimiento a otras especies distintas de *A. baumannii*, como también identificar características comunes en cepas patógenas oportunistas las que podrían contribuir a la generación de nuevas metodologías para identificar las especies más patógenas y enfrentar la infección causada por *Acinetobacter*.

## OBJETIVOS

Los objetivos específicos de este capítulo comprenden el estudio de nueve cepas clínicamente relevantes del género *Acintobacter* en los siguientes aspectos:

- Análisis de marcadores fenotípicos posiblemente relacionados con virulencia (actividad de enzimas hidrolíticas como lipasas y proteasas, formación de biofilm, hemólisis, crecimiento a 44°C, perfil de resistencia a antibióticos, producción de sideróforos de tipo catecol, motilidad celular y producción de autoinductores de QS)
- Búsqueda de genes *luxI* y *luxR*
- Análisis filogenético de proteínas LuxI y LuxR

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepas y condiciones de cultivo.** Las cepas bacterianas utilizadas en este capítulo se describen en la Tabla 4. Si no se aclara de otra manera, las cepas de *Acinetobacter* fueron cultivadas en Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 30 ml de caldo Lisogénico (LB). La cepa *Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 fue cultivada hasta fase de crecimiento exponencial en medio M9 conteniendo glucosa 0,4% (p/v) y gentamicina (30 µg/ml) a 29°C. Las células se centrifugaron a 12000 x g durante 15 min a 4°C y el pellet fue resuspendido en un volumen equivalente a 1/20 del volumen original en el mismo medio conteniendo glicerol 20% (v/v). Esta suspensión fue guardada en crioviales de 1 ml a - 80°C hasta su uso. *Chromobacterium violaceum* CV026 se cultivó en medio LB conteniendo kanamicina (25 µg/ml) a 28°C. Todas las cepas fueron cultivadas con agitación (215 rpm).

**Actividad de lipasas y proteasas.** La actividad lipasa fue medida en los sobrenadantes de cultivo como se describió previamente (Kok y col., 1993) usando p-nitrofenil palmitato como sustrato. El coeficiente molar de absorción del p-nitrofenol (pNP) en el buffer del ensayo a pH 8 era de 15100 M<sup>-1</sup>. Una unidad de actividad de enzima se define como la cantidad de enzima necesaria para formar 1 µmol/min de pNP. La actividad proteolítica fue medida de acuerdo al método previamente descrito (Vazquez y col., 2005), exceptuando que la incubación fue realizada a 30°C.

**Ensayo de biofilm.** Las cepas de *Acinetobacter* fueron cultivadas en Erlenmeyers con medio LB durante 16 h a 30°C con agitación (215 rpm). Los cultivos fueron diluídos 1/100 con medio LB fresco y con 200 µl de la suspensión celular se inoculó cada *well* de una placa de poliestireno estéril de 96-*well*. Luego de 24 h a 30°C, 50 µl de muestra de cada *well* se diluyó con 150 µl de LB y se midió la DO a 600 nm. Las muestras remanentes fueron cuidadosamente removidas y los *wells* fueron lavados tres veces con 200 µl de PBS, secados por posición invertida y teñidos con una solución de cristal violeta (CV) 1% (p/v) durante 20 min. Los *wells* fueron lavados cinco veces con 400 µl de PBS, las células teñidas con CV fueron solubilizadas con 200 µl de etanol con agitación a 80 rpm durante 30 min y se midió la DO<sub>587</sub>. Los resultados se expresaron como DO<sub>587</sub>/DO<sub>600</sub>. Un blanco de reacción se realizó en las mismas condiciones utilizando medio LB sin inocular. El ensayo se realizó dos veces y cada cepa fue ensayada en una placa de 96-*well*. Los resultados se expresan como media ± DS.

**Tabla 4. Cepas bacterianas utilizadas en el capítulo 1**

| Cepas                                      | Fuente / descripción  | Origen/referencia                             |
|--|---|---|
| <i>A. calcoaceticus</i> RUH 0584 *         | Suelo   | Rotterdam, Holanda (Janssen y col., 1997)     |
| <i>A. baumannii</i> RUH 0875 *             | Orina   | Rotterdam, Holanda (Janssen y col., 1997)     |
| <i>A. baumannii</i> RUH 0134 *             | Orina   | Rotterdam, Holanda (Janssen y col., 1997)     |
| <i>A. pittii</i> RUH 0509 *                | Bronquios   | Nijmegen, Holanda (Janssen y col., 1997)      |
| <i>A. nosocomialis</i> RUH 0503 *          | Orina   | Nijmegen, Holanda (Janssen y col., 1997)      |
| <i>A. haemolyticus</i> RUH 0044 *          | Aire  | Rotterdam, Holanda (Janssen y col., 1997)     |
| <i>A. junii</i> RUH 0204 *                 | Sangre  | Rotterdam, Holanda (Tjernberg y Ursing, 1989) |
| <i>A. Iwoffii</i> RUH 0045 *               | Sangre  | Rotterdam, Holanda (Janssen y col., 1997)     |
| <i>A. radioresistens</i> RUH 3517 *        | Almohada  | Hengelo, Holanda. (Janssen y col., 1997)      |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1/pZLR4 | Biosensor para la detección de AHL con cadena acilo media a larga † | Instituto SILS ‡ (Cha y col., 1998)           |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> CV 026    | Biosensor para la detección de AHL con cadena acilo corta §         | Instituto SILS ‡ (McClellan y col., 1997)     |

\* Cepas de la colección de L. Dijkshoorn, Centro Médico Universitario de Leiden, Leiden, Holanda.

† Cepa usada para la detección de todas las 3-oxo-C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>AHL, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>AHL y 3-OH-C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>AHL (Farrand y col., 2002; Steindler y Venturi, 2007).

‡ *Swammerdam Institute for Life Sciences*, Universidad de Amsterdam, Holanda.

§ Cepa usada para la detección de C<sub>4</sub>-C<sub>8</sub>AHL y 3-oxo-C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>AHL (Steindler y Venturi, 2007).

**Hemólisis.** Las cepas de *Acinetobacter* fueron estriadas en placas de agar Columbia (Bio Merieux) suplementadas con sangre de oveja 5 % (v/v) e incubadas a 30°C durante 48 h. La hemólisis se observó como una zona clara alrededor de las colonias.

**Ensayo de resistencia a antibióticos.** La susceptibilidad a antibióticos fue testada con el método de difusión de discos Kirby-Bauer (Bauer y col., 1966), usando el protocolo CLSI. Los antibióticos



seleccionados para el análisis fueron gentamicina, ceftazidima, netilmicina, tobramicina, ofloxacina, tetraciclina, ampicilina-sulbactam, piperacilina, imipenem, cotrimoxazol, meropenem y amikacina. Todas las cepas fueron evaluadas por su perfil de resistencia antibiótica y se incluyeron en uno de las siguientes categorías: S, sensible a todos los antibióticos y MR, resistente a más de dos antibióticos.

**Determinación de sideróforos tipo catecol.** Las cepas fueron cultivadas a 30°C en LB conteniendo glucosa 0,5% (p/v) durante ~ 8 h, se realizó una dilución 1/100 y con esta se inocularon cuatro Erlenmeyers conteniendo el mismo medio. A dos Erlenmeyers se les agregó además una solución de ácido etilen-diamino-di hidroxifenil-acético (EDDHA) a fin de obtener una concentración final de 400 µM de este complejante de hierro y los cuatro Erlenmeyers fueron cultivados durante 16 h con agitación (250 rpm). La determinación de catecoles de los sobrenadantes de cultivo se realizó por el método de Arnow (Arnow, 1973) como se describió previamente (Nudel y col., 2001). La concentración de catecoles se normalizó a la biomasa medida por DO<sub>580</sub> y los resultados se expresaron como µM/DO<sub>580</sub>. Los experimentos se realizaron por duplicado y los resultados se analizaron por ANOVA (n: 18).

**Ensayo de motilidad celular.** El movimiento celular se evaluó según la metodología previamente descrita (Mussi y col., 2010). Brevemente, se prepararon placas de Petri con un medio que contenía bactotripton (10 g/l), NaCl (5 g/l) y agarosa 0,3% (p/v). Las placas fueron inoculadas en la superficie con muestra tomada con un palillo estéril de una placa de LB crecida durante 16 h o con 3 µl de un cultivo líquido en fase exponencial (DO<sub>600</sub>: 0,3) e incubadas a 24°C durante 20-24 h en oscuridad o bajo luz azul. Se utilizaron luces azules de tipo LED con un pico de emisión centrado a 456 nm y con una intensidad de 5 a 7 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> determinada con un espectroradiómetro LI-COR LI-1800. Luego de los períodos de incubación indicados, se midieron los diámetros de migración en muestras triplicadas y se calculó la media ± DS.

**Detección de AHL.** Placas de LB fueron estriadas en forma perpendicular con la cepa en estudio (*Acinetobacter*) y la cepa de reporte (*Agrobacterium tumefaciens* NT1/pZLR4 o *Chromobacterium violaceum* CV026) y se incubaron a 30°C durante 24 h. Cuando se utilizó *C. violaceum* CV026 como cepa de reporte, se utilizó una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* como control positivo y cuando se

utilizó *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 como cepa de reporte, se le agregó 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal) (40  $\mu$ g/ml) al medio de cultivo.

**Detección de AHL en placas de cromatografía en capa delgada (TLC).** Las muestras fueron preparadas a partir de cultivos crecidos en LB suplementado con glucosa 0,5%(p/v) durante 16 h. Los cultivos fueron centrifugados a 10000 rpm durante 10 min a 4°C, el pH de los sobrenadantes se ajustó a 5 y luego se realizó una doble extracción con igual volumen de cloruro de metileno. Las fracciones extraídas se juntaron, se secaron con sulfato de sodio anhidro, se resuspendieron en 5 ml de metanol y se evaporaron bajo flujo de nitrógeno. Los extractos fueron disueltos en metanol y analizados en placas de 7,5 x 5 cm de TLC Silicagel 60 RP-18 F<sub>254</sub>S (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) usando metanol:agua (60:40) como fase móvil. Cada placa fue también sembrada con un extracto de medio de cultivo sin inocular como blanco y 2  $\mu$ l de las soluciones 22 mM 3-OH-C<sub>12</sub>AHL o 3-oxo-C<sub>12</sub>AHL en acetonitrilo como referencia. Luego del secado, las placas se cubrieron con 20 ml de una suspensión preparada con medio M9 conteniendo agarosa 1% (p/v), 1 ml de solución stock de *A. tumefaciens* NT1/pZLR4 en y X-gal (40  $\mu$ g/ml). Las placas se incubaron a 29°C durante 16-24 h.

**Detección de secuencias codificantes para *luxI* y *luxR* en *Acinetobacter*.** El ADN genómico de las cepas de *Acinetobacter* fue extraído con el kit *Illustra blood genomic Prep Mini Spin Kit* (GE, Healthcare, Buckinghamshire, UK). Las amplificaciones por PCR se realizaron con la enzima *GoTaq* (Promega) usando oligonucleótidos diseñados a través de un consenso de diez secuencias genómicas de *Acinetobacter* para *luxI* y nueve secuencias para *luxR*, todas estas depositadas en la base de datos NCBI (NCBI-Resource-Coordinator, 2012). Las secuencias utilizadas para realizar el consenso *luxI* correspondían a genes codificantes para proteínas identificadas como AHL-sintasas (PF00765), mientras que las utilizadas para el consenso *luxR* correspondían a genes codificantes para proteínas con dominio N-terminal de unión a AHL (PF03472) y dominio C-terminal hélice-giro-hélice (PF00196). Las secuencias correspondientes a *luxI* se amplificaron usando los oligonucleótidos *luxI* PF (5'-GGTTGGGAGTTGAACTGTCC-3') y *luxI* PR (5'-AAACGTTCTACTCCAAGAGG-3'); las secuencias correspondientes a *luxR* se amplificaron usando los oligonucleótidos *luxR* PF (5'-TCGGATTTGATTATTGCGCTTATG-3') y *luxR* PR (5'-ACAGCTCGAATAGCTGCTG-3') (Anexo 1 Figura 42). La reacción de amplificación comenzó con

un paso de desnaturalización a 95°C durante 2 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 45 seg, hibridación a 58°C durante 45 seg y extensión a 72°C durante 1 min. Los tamaños de los fragmentos amplificados para *luxI* y *luxR* esperados eran 370 bp y 603 bp, respectivamente. La secuenciación de los fragmentos de ADN fue realizada en el Instituto de Biotecnología; INTA, Castelar, mediante métodos de secuenciamiento automático (Anexo 1 Figura 43). Las secuencias de ADN fueron comparadas con la correspondiente al gen *abaI* de *A. baumannii* M2, hasta el momento el único gen del género *Acinetobacter* cuya proteína, AbaI, ha sido caracterizada funcionalmente como sintasa del sistema de QS (Niu y col., 2008).

**Análisis filogenético.** Las secuencias de las proteínas putativas LuxR y LuxI consideradas en este análisis fueron obtenidas de la base de datos UniProt. Las secuencias de ADN correspondientes a las cepas en análisis fueron traducidas en secuencias proteicas usando la herramienta Transeq del sitio European Bioinformatics [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html>] (Anexo 1 Figura 43) y las secuencias fueron alineadas usando ClustalW (Thompson y col., 1994). Los árboles se construyeron con el método de *Neighbor-joining* usando el programa MEGA 5 (Tamura y col., 2011). Para los árboles de las secuencias pertenecientes a las familias LuxI y LuxR se utilizó el modelo de sustitución  $\gamma$  con un parámetro  $a = 2.0$ , mientras que para el árbol de secuencias 16SARNr se utilizó el modelo de sustitución Tamura-Nei. En todos los casos la confianza de los árboles fue determinada por el análisis de 1000 replicados *bootstrap*. Al analizar los datos con otros métodos (*Maximum Likelihood* y *Minimal Evolution*) se obtuvieron árboles con idéntica topología.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Análisis de marcadores fenotípicos relacionados con virulencia

Nueve cepas del género *Acinetobacter* fueron analizadas en cuanto a marcadores fenotípicos posiblemente relacionados con virulencia.

#### 1.1. Actividad de lipasas y proteasas

El análisis de la actividad de lipasas en las nueve cepas de *Acinetobacter*, reveló que *A. junii* RUH 0204 y *A. haemolyticus* RUH 0044 no tenían dicha actividad. La producción de las restantes siete cepas se muestra en la Figura 8. La cepa con mayor actividad lipasa fue *A. calcoaceticus* RUH 0584, mientras que el resto de las cepas, aisladas de pacientes o no, mostraron niveles muy bajos de la enzima. En cambio un estudio proteómico realizado en *A. baumannii* 77 demostró que cuando esta cepa se encuentra formando biofilm existe una sobreexpresión de proteínas que podrían estar relacionadas con el proceso de virulencia, dentro de estas se encontró una lipasa, lo que sugeriría su participación en el reciclaje de lípidos dentro de la matriz (Marti y col., 2011).

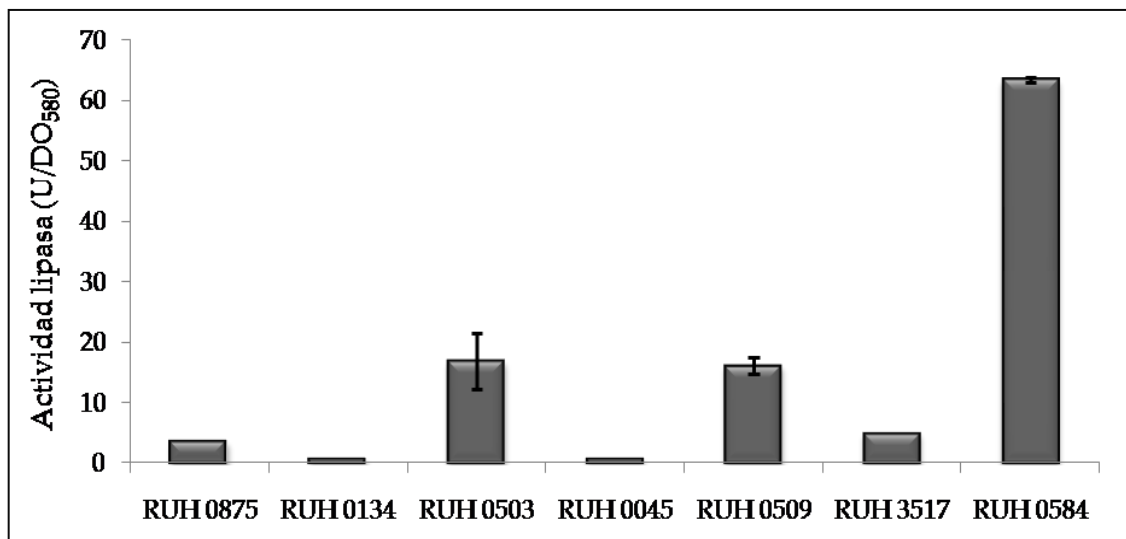


Figura 8. Actividad lipasa en sobrenadantes de cultivo de siete cepas clínicamente relevantes del género *Acinetobacter*.

El estudio de la actividad proteasa en los sobrenadantes de cultivo de las nueve cepas analizadas demostró que ninguna de estas presentaba dicha actividad. Si bien las proteasas son consideradas participantes en el proceso de virulencia en bacterias debido a su capacidad de degradar proteínas estructurales y funcionales del hospedador, sólo algunos pocos mecanismos mediante los cuales la proteólisis participa en el proceso de patogénesis han sido revelados (Ingmer y Brondsted, 2009;

Lantz, 1997). Más aún, la actividad proteasa no sería un elemento indispensable en el mecanismo de patogenicidad de *Acinetobacter*.

## 1.2. Formación de biofilm

Los resultados mostraron que las nueve cepas formaron biofilm en superficies abióticas (Figura 9). La cepa *A. junii* RUH 0204 mostró una relación DO<sub>587</sub>/DO<sub>600</sub> de 26, siendo esta significativamente mayor a las relaciones correspondientes a las demás cepas, de 0,61 a 2,99. Nuestros resultados concuerdan con un trabajo previo que demostró que la formación de biofilm no varía significativamente entre especies del género *Acinetobacter*, pero se demostró que la respuesta inflamatoria del hospedador (IL-6 e IL-8) se encontraba significativamente disminuída frente a la exposición a *A. baumannii* que a especies que raramente causan infección, como *A. junii* (de Breij y col., 2010).

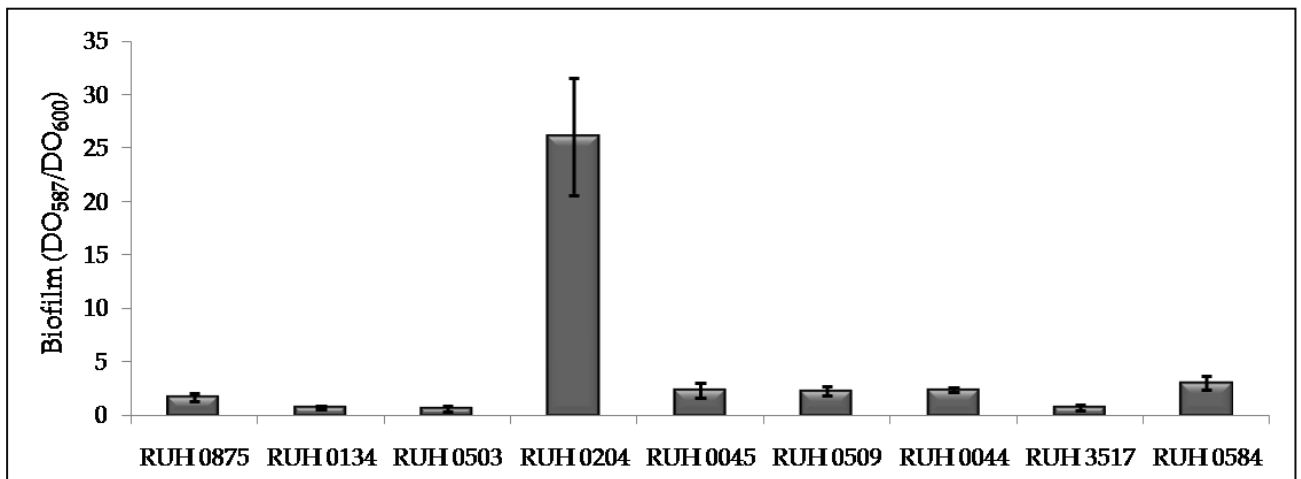


Figura 9. Formación de biofilm en cepas clínicamente relevantes del género *Acinetobacter*.

## 1.3. Hemólisis

El potencial hemolítico de las cepas de *Acinetobacter* fue evaluado en placas de agar Columbia suplementadas con sangre de oveja 5 % (v/v). Luego de la incubación a 30°C durante 48 h, todas las cepas formaron colonias, pero únicamente *A. haemolyticus* RUH 0044 produjo una amplia zona clara alrededor de las colonias, comparable con la β-hemólisis producida por *Bacillus cereus* (Figura 10) (Ryan y col., 2004). Estos resultados concuerdan con el análisis realizado por Tayabali y col, donde únicamente *A. haemolyticus* y *A. venetianus* RAG-1 mostraron actividad hemolítica apreciable, mientras que *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. guillouiae* y *A. junii* produjeron una muy débil respuesta luego de seis días de incubación y *A. Iwoffii* no mostró actividad hemolítica

(Tayabali y col., 2012). Curiosamente, estudios realizados con cepas de *A. baumannii* demostraron que si bien no se detectó hemólisis en presencia de sangre de oveja, todas las cepas produjeron hemólisis de eritrocitos de caballo (Antunes y col., 2011).

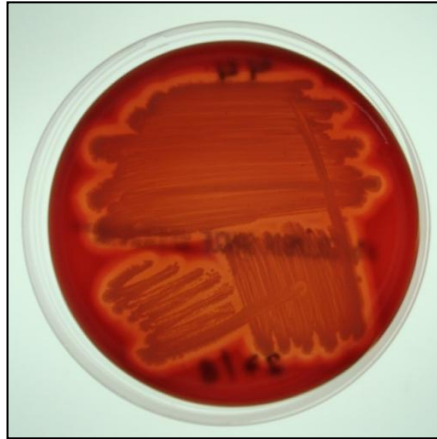


Figura 10. Hemólisis producida por *A. haemolyticus* RUH 0044.

#### 1.4. Resistencia a antibióticos

Considerando que la resistencia a antibióticos es una de las características que hace que miembros del género *Acinetobacter* tengan un particular interés dentro de las infecciones nosocomiales, todas las cepas fueron evaluadas en cuanto a su perfil de resistencia antibiótica y fueron clasificados como sensibles (s), aquellas que presentaron sensibilidad a todos los antibióticos, y multirresistentes (MR) a las que fueron resistentes a dos o más antibióticos. La Tabla 5 muestra que sólo *A. baumannii* y *A. nosocomialis* formaron parte de la categoría MR, mientras que las otras cepas resultaron sensibles.

Tabla 5. Perfil de resistencia a antibióticos de cepas de *Acinetobacter*

| Cepa     | GEN | CTZD | NTIL | TOBR | OFX | TET | AMS | PIP | IMI | CTZ | MER | AMK | Categoría* |
|----------|-----|------|------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------------|
| RUH 0875 | R   | s    | R    | R    | s   | R   | R   | R   | s   | R   | s   | s   | MR         |
| RUH 0134 | R   | R    | s    | R    | R   | R   | i   | R   | R   | R   | R   | R   | MR         |
| RUH 0503 | R   | s    | R    | s    | s   | i   | s   | s   | s   | R   | s   | s   | MR         |
| RUH 0204 | s   | s    | s    | s    | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s          |
| RUH 0045 | s   | s    | s    | s    | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s          |
| RUH 0509 | s   | s    | s    | s    | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s          |
| RUH 0044 | s   | s    | s    | s    | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s          |
| RUH 3517 | s   | s    | s    | s    | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s   | s          |
| RUH 0584 | s   | s    | s    | s    | s   | s   | s   | i   | s   | s   | s   | s   | s          |

Los antibióticos seleccionados para el análisis fueron gentamicina (GEN), ceftazidima (CTZD), netilmicina (NTIL), tobramicina (TOBR), ofloxacina (OFX), tetraciclina (TET), ampicilina-sulbactam (AMS), piperacilina (PIP), imipenem (IMI), cotrimoxazol (CTZ), meropenem (MER) y amikacina (AMK). s: sensible, i: sensibilidad intermedia, R: resistente. \*s: sensible a todos los antibióticos y MR, resistente a más de dos antibióticos.

### 1.5. Producción de sideróforos de tipo catecol

Luego de la invasión, los patógenos bacterianos deben sobrevivir en un ambiente con limitación de hierro, un nutriente necesario para replicarse y causar enfermedad en el hospedador. Uno de los mecanismos desarrollados para la captación de hierro implica la producción de sideróforos y los sistemas involucrados en este proceso han sido estudiados para *A. baumannii* (Dorsey y col., 2004; Eijkelkamp y col., 2011). Se sugiere que una cepa de *A. baumannii* es capaz de producir más de un sideróforo de tipo catecol y además, existe variación en el tipo de sideróforo entre distintos aislamientos clínicos (Dorsey y col., 2004).

Con el objeto de ampliar el estudio de estos quelantes de hierro a otras especies, realizamos el análisis de la producción de sideróforos de tipo catecol en las nueve cepas clínicas del género *Acinetobacter*. El análisis de varianza aplicado a las cepas que provenían de aislamientos de pacientes respecto a las aisladas del ambiente hospitalario reveló que las primeras secretaron mayores cantidades de catecoles con un grado de significación aceptable ( $p < 0,03$ ). Este resultado reafirma la importancia de este sistema de captación de hierro en la patogenicidad de *Acinetobacter*.

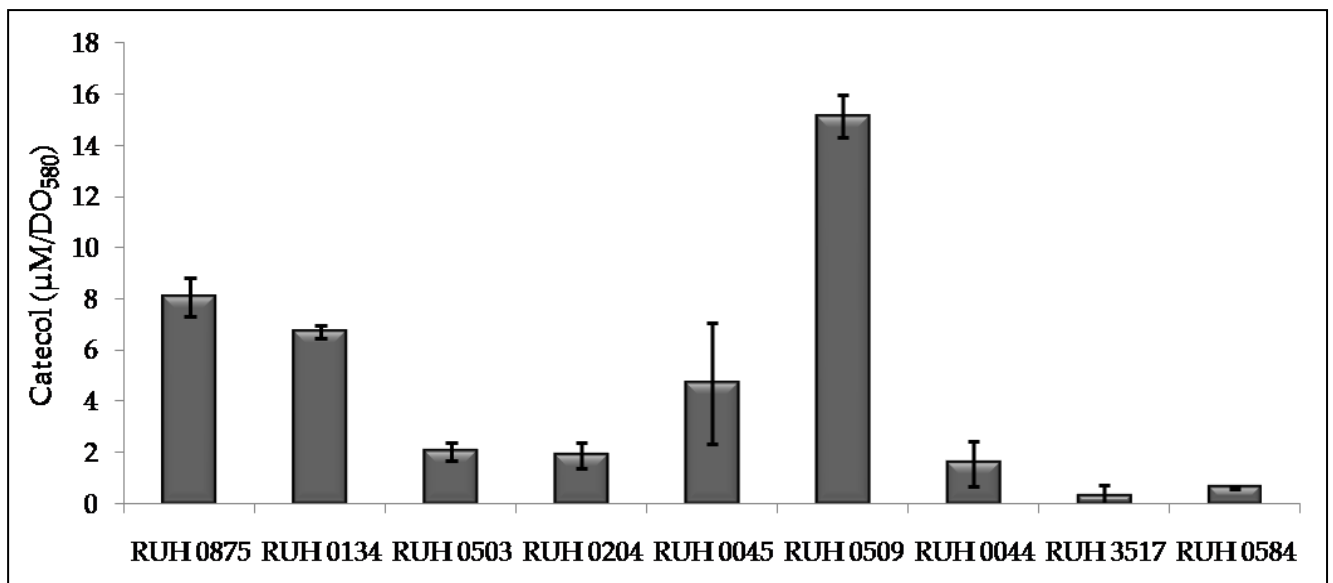


Figura 11. Producción de sideróforos de tipo catecol en cepas clínicamente relevantes del género *Acinetobacter*.

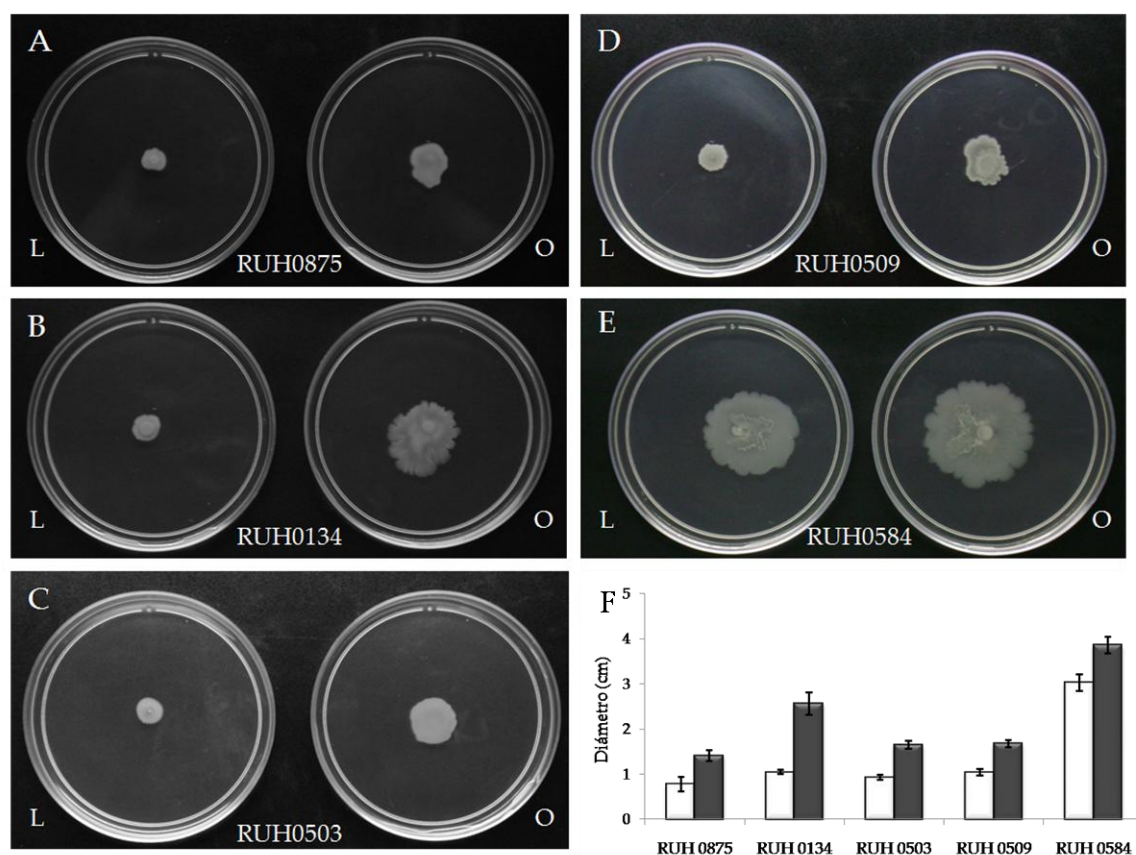
### 1.6. Motilidad en condiciones de luz y oscuridad

El estudio de la motilidad en condiciones de luz y oscuridad de las nueve cepas en estudio de *Acinetobacter* reveló que mientras que las cepas *A. junii* RUH 0204, *A. Iwoffii* RUH 0045, *A. haemolyticus* RUH 0044 y *A. radioresistens* RUH 3517 no mostraron motilidad en las condiciones

ensayadas, las cepas que forman parte del complejo Acb (*A. baumannii* RUH 0875, *A. baumannii* RUH 0134, *A. nosocomialis* RUH 0503, *A. pittii* RUH 0509 y *A. calcoaceticus* RUH 0584) no sólo mostraron motilidad, sino que esta fue inhibida por la luz azul (Figura 12). Estos resultados sugieren que estas cepas poseen fotorreceptores capaces de percibir la luz azul y generar una señal que desencadena la inhibición del movimiento.

Algunos estudios han revelado la presencia de fotorreceptores de luz azul en bacterias quimiotróficas y su relación con la virulencia. Este es el caso de *Brucella abortus* que posee un dominio LOV-HK que al percibir la luz azul aumenta la invasión a los macrófagos (Swartz y col., 2007), mientras que la proteína BLUF de *A. baumannii* ATCC 17978 (BlsA) es responsable de la inhibición del movimiento y de la formación de biofilm, y del aumento de la muerte de filamentos de *Candida albicans* (Mussi y col., 2010). Según nuestros resultados, la motilidad *per se* no podría ser considerada como un factor de virulencia crucial para la patogénesis, debido a que algunas cepas aisladas del ambiente presentaron motilidad y algunas cepas patógenas aisladas de pacientes resultaron no móviles. Considerando que un análisis comparativo de los genomas de dos cepas de *A. baumannii* y la cepa ambiental *A. baylyi* ADP1 evidenciaron que esta última carece de 3 genes con importante rol en la virulencia con función putativa de reguladores transcripcionales (Vallenet y col., 2008), podría postularse que la señalización generada por la luz azul sería capaz de afectar la funcionalidad de alguno de estos reguladores y desencadenar una respuesta de virulencia aumentada en *A. baumannii*.

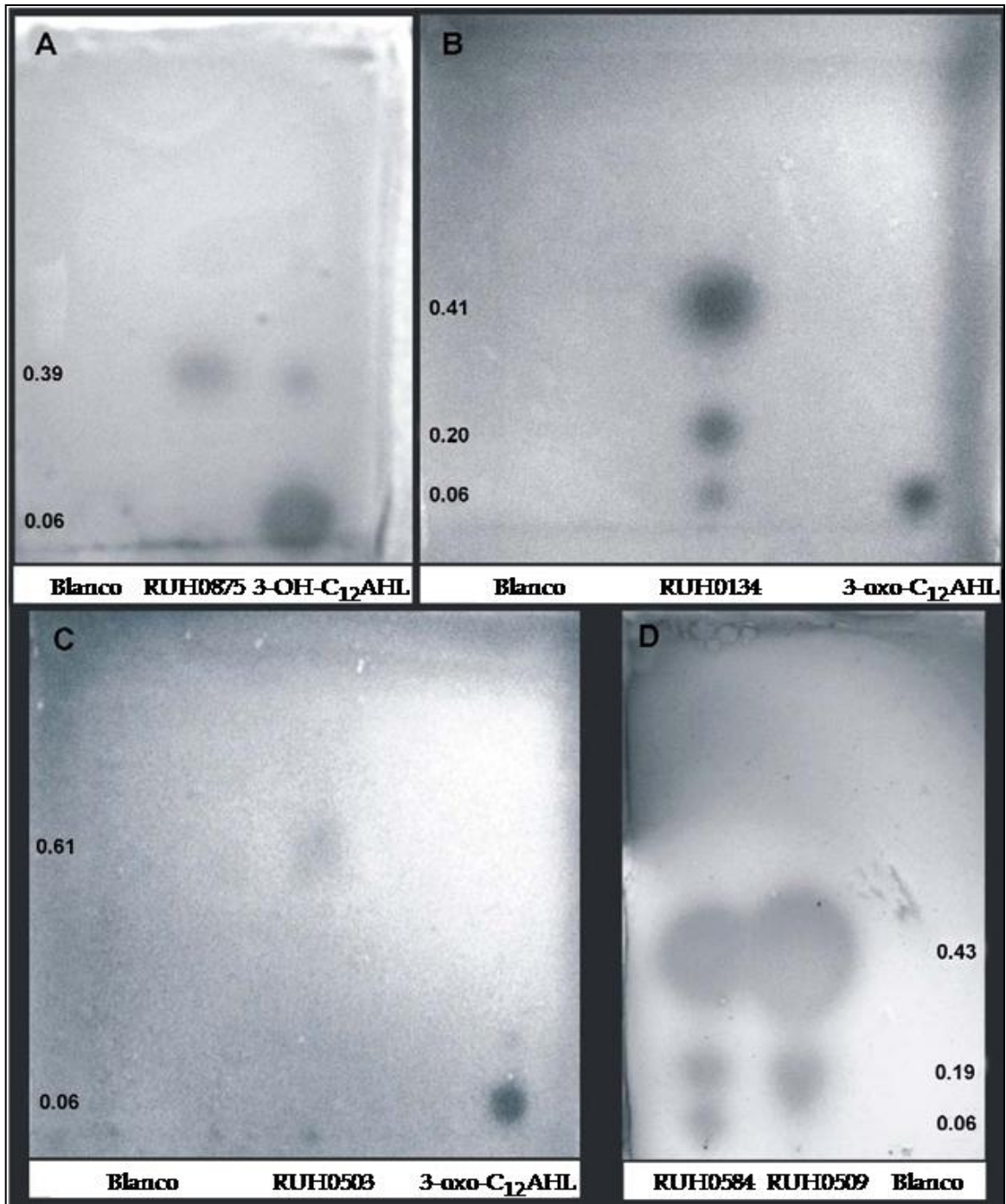




**Figura 12. Efecto de la luz azul en la motilidad de cepas clínicamente relevantes de *Acinetobacter*.** Placas inoculadas con un palillo estéril conteniendo una colonia o 3  $\mu$ l de cultivo en crecimiento exponencial ( $DO_{600}$ : 0,3) de *A. baumannii* RUH 0875 (A), *A. baumannii* RUH 0134 (B), *A. nosocomialis* RUH 0503 (C), *A. pittii* RUH 0509 (D) o *A. calcoaceticus* RUH 0584 (E) e incubadas bajo luz azul (L) u oscuridad (O) a 24°C durante 20–24 h. F. Diámetros del movimiento luego de la incubación bajo luz azul (barras blancas) u oscuridad (barras grises) a 24°C durante 20–24 h. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresan como media  $\pm$  DS.

### 1.7. Producción de autoinductores de QS (AHL)

El ensayo de detección de AHL en las nueve cepas de *Acinetobacter* demostró que ninguna de estas producía AHL de cadena corta (C<sub>4</sub>-C<sub>6</sub>), mientras que las cepas pertenecientes al complejo Acb producían AHL de cadena media o larga detectadas por *A. tumefaciens* NT1/pZLR4. Estas últimas fueron detectadas mediante placas de RP-TLC (Figura 13). La intensidad de las señales fue variable, mientras que las señales de *A. pittii* RUH 0509 fueron detectadas en 1 ml de sobrenadante de cultivo, las señales del resto de las cepas fue detectada usando 5-30 ml de sobrenadante de cultivo. En todos los casos las moléculas señal mostraron el típico comportamiento de lactonas, siendo estables a pH ácido y desapareciendo a pH alcalino, de donde fueron recuperadas luego de la acidificación. Las placas RP-TLC mostraron un número de manchas variable, desde 1 a 3, pero la medida de la movilidad, medida como Rf's, no mostraron diferencias significativas.



**Figura 13. Detección de AHL en placas RP-TLC.** Análisis de la producción de señales AHL por las cepas *A. baumannii* RUH 0875(A), *A. baumannii* RUH 0134 (B), *A. nosocomialis* RUH 0503 (C), *A. calcoaceticus* RUH 0584 y *A. pittii* RUH 0509 (D). Cada placa también se inoculó con medio de cultivo (blanco) y 2 µl de 22 mM 3-OH-C<sub>12</sub>AHL o 3-oxo-C<sub>12</sub>AHL como referencia.

Los marcadores fenotípicos relacionados con virulencia de las nueve cepas clínicamente relevantes de *Acinetobacter* se resumen en la Tabla 6.

**Tabla 6. Marcadores fenotípicos relacionados con virulencia en cepas de *Acinetobacter***

| Cepa  | RUH 0875    | RUH 0134                    | RUH 0503     | RUH 0204     | RUH 0045    | RUH 0509            | RUH 0044    | RUH 3517    | RUH 0584                    |
|---|-------------|-----------------------------|--------------|--------------|-------------|---------------------|-------------|-------------|-----------------------------|
| Lipasa (U/DO <sub>580</sub> )                   | 3,50 ± 0    | 0,70 ± 0                    | 16,80 ± 4,59 | ND*          | 0,70 ± 0    | 16,11 ± 1,4         | ND*         | 4,9 ± 0     | 63,41 ± 0,4                 |
| Biofilm (DO <sub>587</sub> /DO <sub>600</sub> ) | 1,69 ± 0,41 | 0,72 ± 0,16                 | 0,61 ± 0,26  | 26,10 ± 5,47 | 2,33 ± 0,73 | 2,25 ± 0,40         | 2,40 ± 0,19 | 0,75 ± 0,26 | 2,99 ± 0,65                 |
| Hemólisis                                       | -           | -                           | -            | -            | -           | -                   | +           | -           | -                           |
| Catecol (µM/DO <sub>580</sub> )                 | 8,07 ± 0,74 | 6,73 ± 0,26                 | 2,02 ± 0,34  | 1,88 ± 0,50  | 4,69 ± 2,37 | 15,15 ± 0,85        | 1,56 ± 0,90 | 0,29 ± 0,41 | 0,62 ± 0,06                 |
| Crecimiento a 44°C                              | +           | +                           | +            | -            | -           | +                   | -           | +           | +                           |
| Resistencia a antibióticos                      | MR          | MR                          | MR           | s            | s           | s                   | s           | s           | s                           |
| Motilidad en oscuridad                          | +           | +                           | +            | -            | -           | +                   | -           | -           | +                           |
| Señales de QS                                   | 1 mancha    | 3 manchas                   | 1 mancha     | -            | -           | 2 manchas           | -           | -           | 3 manchas                   |
|   | Rf:<br>0,39 | Rf:<br>0,06<br>0,20<br>0,41 | Rf:<br>0,61  |              |             | Rf:<br>0,18<br>0,42 |             |             | Rf:<br>0,06<br>0,19<br>0,43 |

\*ND: no detectado

## 2. Búsqueda de genes *luxI* y *luxR*

Con el fin de investigar los genes implicados en el sistema de QS en las cepas en estudio, se diseñaron oligonucleótidos usando un consenso de secuencias correspondientes a genes *luxI* y *luxR* de diez y nueve genomas de *Acinetobacter*, respectivamente (ver Anexo 1, Figura 42). Se obtuvo una amplificación de los tamaños esperados en todas las cepas que mostraron señales de QS en placas de RP-TLC.

El porcentaje de identidad de los homólogos de *luxI* varió de 85,77% a 89,30%, mientras que el porcentaje de identidad de las secuencias aminoacídicas varió de 86,67% a 95,56%. La comparación de las secuencias de ADN con la correspondiente al gen *abaI* de *A. baumannii* M2, hasta el momento el único gen del género *Acinetobacter* cuya proteína (AbaI) ha sido caracterizada funcionalmente como sintasa del sistema de QS (Niu y col., 2008), reveló un porcentaje de identidad de 97,82% para RUH 0134, 96,45% para RUH 0875, 87,68% para RUH 0584, 85,52% para RUH 0509 y 84,04% para RUH 0503. Los homólogos de *luxR* mostraron menor identidad de secuencia, variando de

85,54% a 87,83%, mientras el porcentaje de identidad de las secuencias aminoacídicas varió de 90,06% a 93,13%. El alto porcentaje de identidad de aminoácidos en las sintasas y en los receptores/reguladores mostró una baja tasa de mutaciones al azar en ambos genes. Además, el alto porcentaje de identidad de secuencia para los genes *luxI* y *luxR* sugeriría que ambos genes estuvieran probablemente organizados en tándem y co-evolucionan juntos en la clase *Gammaproteobacteria*. Esto concuerda con un trabajo previo donde se indica que los genes homólogos a *luxI* y *luxR* se transcriben de manera divergente y presentan una región central de control que podría facilitar la regulación coordinada de ambos genes (Fuqua y col., 1996). Sin embargo, esto se opone a lo descrito para *Aeromonas*, donde las secuencias *luxI* y *luxR* mostraron una gran variación en el porcentaje de identidad de secuencias (Jangid y col., 2007).

Es importante destacar que a pesar de que la búsqueda de los genes homólogos *luxI* y *luxR* se realizó en las nueve cepas en estudio, sólo en aquellas cepas cuyas AHLs habían sido detectadas en placas de RP-TLC pudieron amplificarse ambas secuencias, lo que permite descartar la presencia de genes no funcionales en estas cepas. Más aún, ambos marcadores no fueron encontrados en cepas que no pertenecieran al complejo Acb. En las cepas del complejo Acb se encontraron copias únicas para genes putativos *luxI* y *luxR*, lo cual es consistente con la presencia de una sola secuencia para estos genes en los genomas secuenciados del género *Acinetobacter*. Sin embargo, en algunas cepas se detectaron varias manchas correspondientes a AHLs en la separación por RP-TLC, lo que sugiere que la sintasa podría no ser específica de un único sustrato y así, sintetizar distintas AHLs. Estos resultados coinciden con los que ha sido previamente descrito para *A. baumannii* M2, la cual posee un único gen *luxI* (denominado *abaI*), confirmado por mutantes noqueadas, pero el sobrenadante de cultivo mostró tres manchas en RP-TLC, cada una formada por una mezcla de AHLs (Niu y col., 2008). En este trabajo se utilizó RP-TLC para la detección de AHLs en lugar de placas de sílica de fase normal (González y col., 2009). A pesar de que la TLC-RP afecta ligeramente la sensibilidad del ensayo, disminuyendo en la mayoría de los casos el número de manchas, esta aumentó la resolución en las muestras.

### 3. Análisis filogenético de LuxI y LuxR

Para el análisis evolutivo de las proteínas LuxI y LuxR se utilizaron las secuencias identificadas en miembros de la clase *Gammaproteobacteria* traducidas a proteínas. Tanto el árbol obtenido para las secuencias putativas de la familia LuxI (Figura 14) como para las de la familia LuxR (Figura 15) mostraron que las secuencias del género *Acinetobacter* se encuentran en un único grupo, con la

excepción de la cepa ambiental *A. baylyi* ADP1, la cual se encuentra significativamente separada del resto y se caracteriza por no poseer un gen que pueda ser traducido a un homólogo a LuxI. Esto muestra que el sistema de QS de *A. baylyi* ADP1 está formado por un LuxR desapareado, el que forma parte de la denominada familia “LuxR-solos” (Subramoni y Venturi, 2009). Ambos árboles mostraron que mientras que las cepas RUH 0134 y RUH 0875 se encontraban relacionadas a las secuencias pertenecientes a la especie *A. baumannii*, la cepa RUH 0584 lo estaba con las secuencias pertenecientes a la especie *A. calcoaceticus*. Sin embargo, otros miembros del complejo Acb (cepas RUH 0509 y RUH 0503) se encontraron formando parte de diferentes grupos. Es importante resaltar que LuxI y LuxR acompañaron claramente la ramificación de las especies, sugiriendo un origen temprano de estos genes. En ambos árboles filogenéticos, el género más cercano al grupo correspondiente a *Acinetobacter* fue *Pseudomonas*, con un valor de confianza *bootstrap* de 51% para LuxI y 71% para LuxR. La misma relación se ha encontrado en el análisis de las secuencias 16SARNr (Figura 16). Sin embargo, en este último todas las secuencias correspondientes a *Pseudomonas* se encuentran en un único grupo, mientras que el LuxI de *P. syringae* agrupa con *Yersinia*, separado del resto de los homólogos a LuxI de este género y los LuxR de *Pseudomonas* se encuentran dispersos sin constituir un grupo, como sí lo hacen las secuencias correspondientes a otros géneros de dicho árbol filogenético. Estos resultados concuerdan con la hipótesis que supone que las bacterias han adquirido sus reguladores de QS por transferencia horizontal de genes. Por otro lado, la congruencia total entre los árboles de las familias LuxI y LuxR y el árbol filogenético de 16SARNr concuerda con un origen ancestral para las proteínas del sistema de QS en la clase *Gammaproteobacteria*. Como se ha sugerido previamente, es importante destacar que las bacterias no sólo pueden adquirir nuevos genes estructurales, sino que también pueden adquirir nuevos genes regulatorios a través de transferencia horizontal de genes (Gray y Garey, 2001).



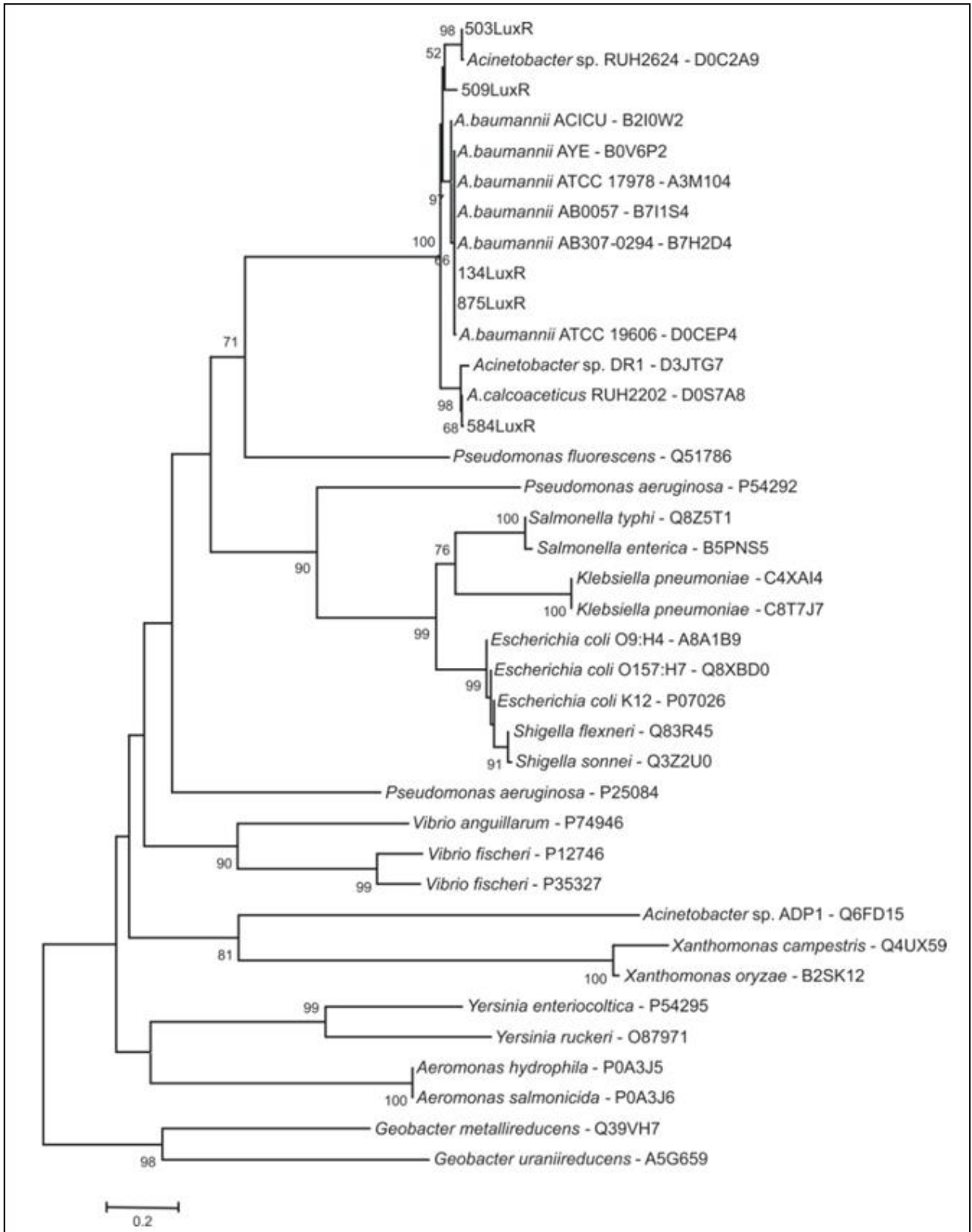


Figura 15. Árbol filogenético de miembros de la familia LuxR de la clase *Gammaproteobacteria* obtenido por el método de *Neighbor-joining*. Las secuencias pertenecientes a la clase *Deltaproteobacteria* (*Geobacter*) funcionan como *outgroup*. De los valores de *bootstrap*, como porcentaje de 1000 replicados, sólo se muestran aquellos que sean mayores o iguales al 50%. Los nombres de las especies se muestran junto al número de acceso de UniProt. La barra de escala indica el número medio de sustituciones por sitio.

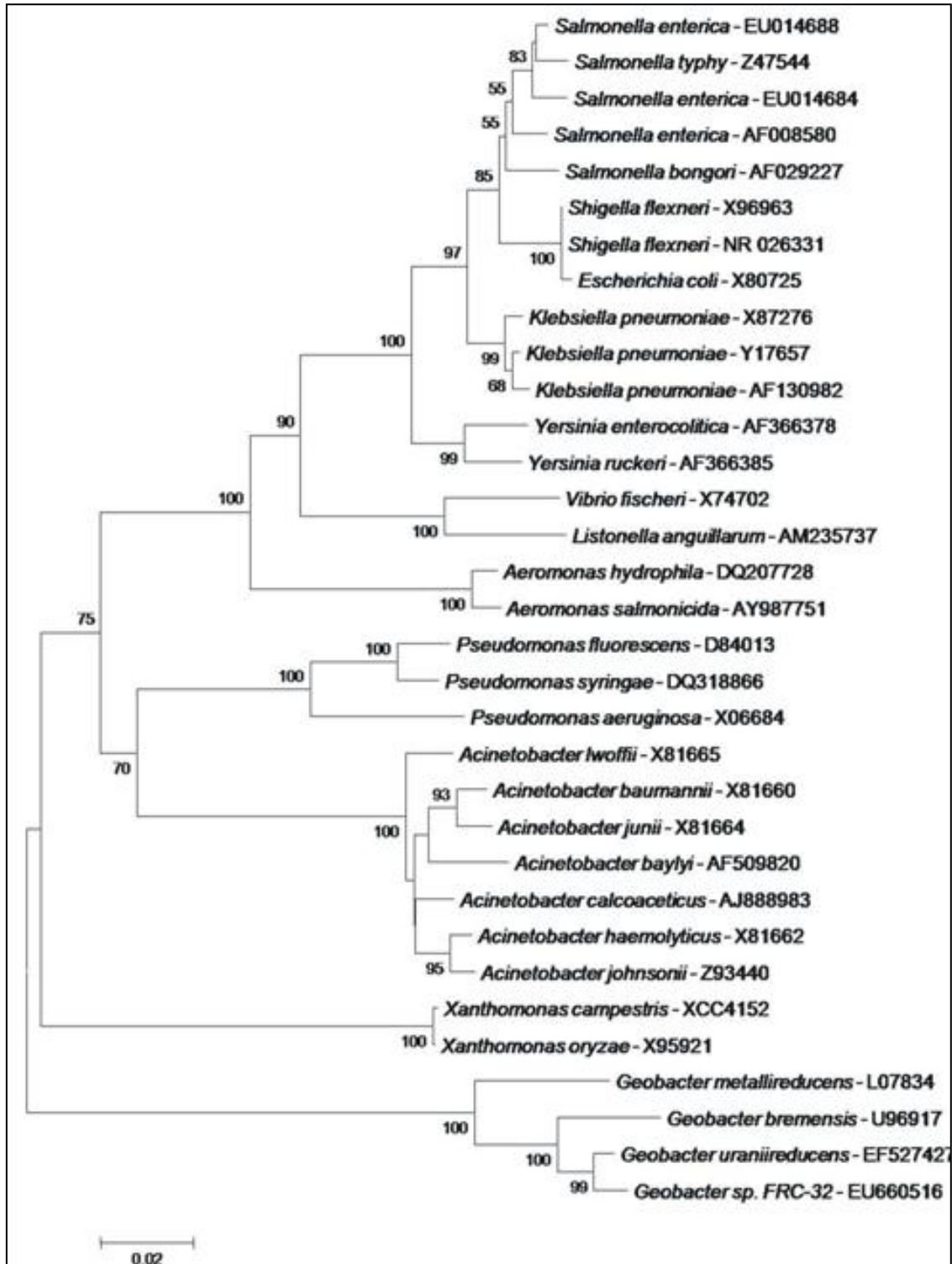


Figura 16. Árbol filogenético de secuencias 16SARNr de bacterias de la clase *Gammaproteobacteria* que contienen secuencias codificantes para LuxI y/o LuxR por método de *Neighbor-joining*. Las secuencias pertenecientes a la clase *Deltaproteobacteria* (*Geobacter*) funcionan como *outgroup*. De los valores de *bootstrap*, como porcentaje de 1000 replicados, sólo se muestran aquellos que sean mayores o iguales al 50%. Los nombres de las especies se muestran junto al número de acceso de UniProt. La barra de escala indica el número medio de sustituciones por sitio.



## CONCLUSIONES

- Dentro de los marcadores fenotípicos relacionados con virulencia analizados, se demostró que:
  - Ninguna de las cepas analizadas mostró actividad proteasa ni produjo AHL de cadena corta.
  - Sólo *A. haemolyticus* RUH 0044 fue positiva para el ensayo de hemólisis.
  - La producción de lipasas, formación de biofilm y el crecimiento a 44°C fueron detectados en la mayor parte de las cepas sin que su distribución pueda asociarse sólo a cepas patógenas oportunistas.
  - La secreción de sideróforos de tipo catecol fue mayor en cepas aisladas de pacientes enfermos que las aisladas del ambiente hospitalario ( $p < 0,03$ ), por lo que este marcador fenotípico podría postularse como un marcador de virulencia en *Acinetobacter*.
  - La resistencia a antibióticos favorecería la persistencia de la enfermedad causada por las cepas de *A. baumannii* y *A. nosocomialis*. Sin embargo, debido a que algunas cepas patógenas fueron sensibles a los antibióticos ensayados, esta característica no puede ser considerada un marcador de virulencia en *Acinetobacter*.
  - Tanto la producción de AHL de cadena media y larga, como la inhibición de la motilidad por la luz azul sólo fueron detectadas en las cepas pertenecientes al complejo Acb.
- Las cepas del complejo Acb fueron las únicas en las que se detectó AHLs de cadena media o larga y se logró obtener las secuencias correspondientes a los genes putativos *luxI* y *luxR*, descartándose la presencia de genes no funcionales.
- En las cepas del complejo Acb se encontraron copias únicas para los genes putativos *luxI* y *luxR*, aunque en algunos casos se detectaron varias señales correspondientes a AHLs, sugiriendo que una única sintasa puede utilizar distintos sustratos y dar origen a distintas AHLs.
- Se demostró un alto porcentaje de identidad de secuencia para los genes putativos *luxI* y *luxR*, sugiriendo su organización en tándem y co-evolución en la clase *Gammaproteobacteria*.

- Los árboles filogenéticos para las secuencias de la familia LuxI y LuxR mostraron que:
  - Las secuencias del género *Acinetobacter* se encontraron en un único grupo a excepción de la secuencia de la familia LuxR de la cepa ambiental *A. baylyi* ADP1.
  - La congruencia total entre los árboles de las familias LuxI y LuxR y el árbol filogenético de 16SARNr concuerda con un origen ancestral para las proteínas del sistema de QS en la clase *Gammaproteobacteria*.
  - La distribución de las secuencias LuxI y LuxR del género *Pseudomonas* reforzó la hipótesis de la adquisición de sus genes reguladores de QS por transferencia horizontal.

# Capítulo 2

**Distribución y organización de fotorreceptores con dominio  
BLUF en bacterias en general y en el género *Acinetobacter* en  
particular**

## INTRODUCCIÓN

Uno de los principios de la microbiología es que los organismos son capaces de percibir los cambios en el ambiente y adaptarse mediante modificaciones en su fisiología. La luz es un factor ambiental esencial y muchos organismos han desarrollado mecanismos para percibir y responder a este estímulo. No sorprende que las bacterias fototróficas hayan desarrollado mecanismos para la regulación del almacenamiento de energía y la conversión de la energía solar mediante fotosíntesis. Sin embargo, la luz es también una amenaza para todos los organismos vivos, ya que produce daño fotooxidativo y muerte. La absorción de la energía lumínica mediante pigmentos fotosintéticos (clorofila) u otras moléculas fotosensibilizadoras (tetrapirroles y flavinas) genera la formación de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) y otras especies reactivas del oxígeno que generan efectos deletéreos en ácidos nucleicos y proteínas (Elias-Arnanz y col., 2011).

Los fotorreceptores son proteínas capaces de absorber la luz a través de sus cromóforos. Sin embargo, la generación de una señalización mediada por luz a través de fotorreceptores específicos era considerada un evento excepcional que sólo se encontraba en organismos fototróficos. En los últimos 15 años, la secuenciación de genomas permitió comprobar la existencia de secuencias putativas codificantes para fotorreceptores también en organismos no fototróficos (quimiotróficos). Sorprendentemente, se encontraron secuencias putativas correspondientes a las seis familias de fotorreceptores en los genomas de bacterias quimiotróficas (van der Horst, 2007).

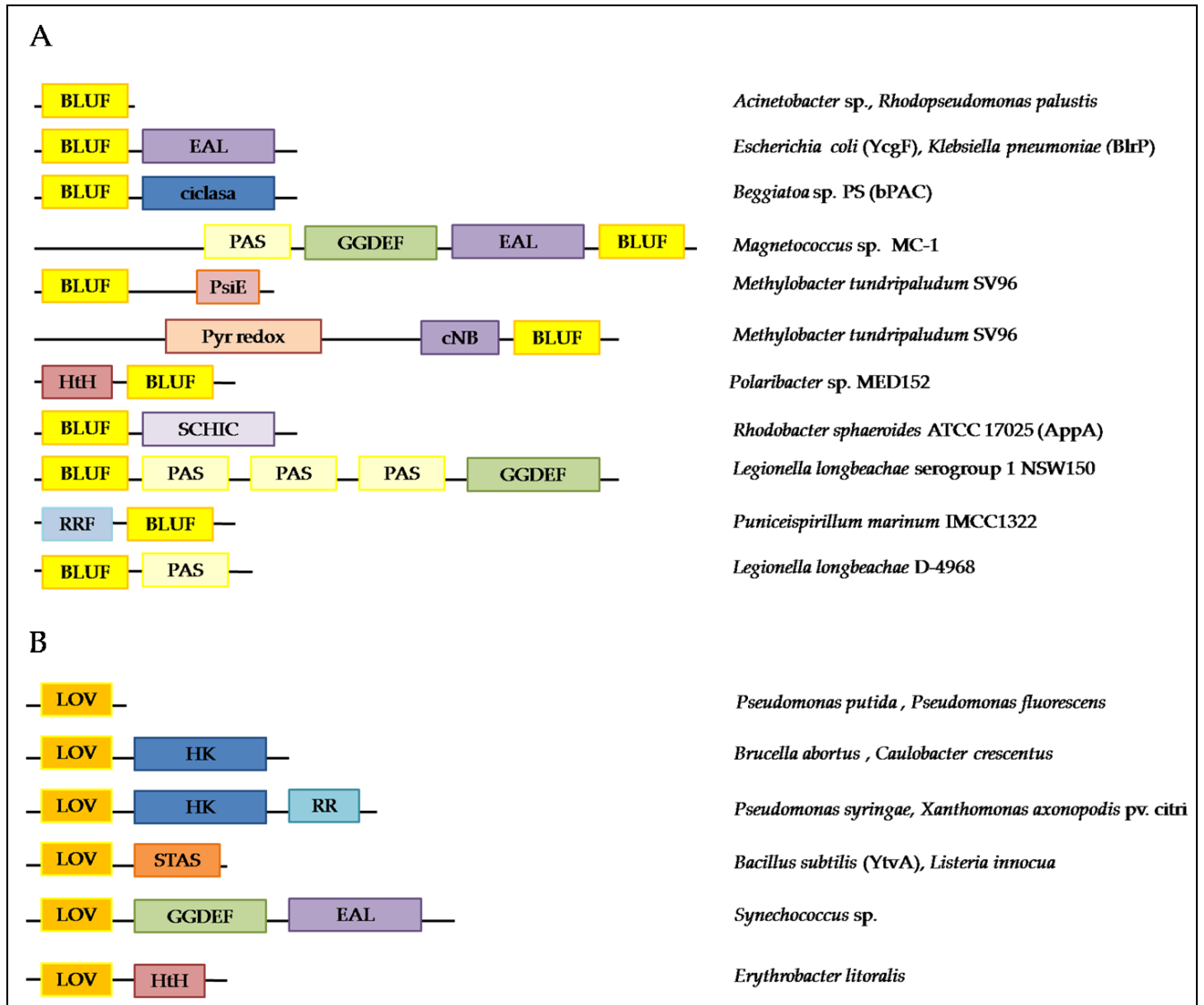
### **Arquitectura de proteínas LOV y BLUF**

Las proteínas conteniendo dominios LOV o BLUF han sido descritas como posibles responsables de las respuestas a la luz en organismos quimiotróficos (Eliás-Arnanz y col., 2011; Gomelsky y Hoff, 2011). Los fotorreceptores se caracterizan por tener un carácter modular, debido a que esos dominios sensores pueden encontrarse conectados, ya sea covalentemente o no, con dominios efectores responsables de su función. El análisis de los genomas procariontes con secuencias codificantes para proteínas putativas con dominios BLUF y LOV permitió evidenciar las distintas arquitecturas en las que estas se organizan (Figura 17).

Dentro de las proteínas BLUF (Figura 17A) la mayoría corresponden a proteínas cortas que solamente poseen un dominio BLUF. Debido a que estas proteínas están involucradas en la traducción de señales y considerando que no pudo encontrarse similitud de su región C-terminal con los motivos de unión a ADN se propone que estas proteínas están involucradas en una

interacción proteína-proteína con su dominio efector. Hasta el momento el único mecanismo dilucidado que demuestra esta interacción es el descrito para PapB de *R. palustis*. Esta proteína BLUF regula la formación de biofilm mediante la interacción con una proteína con dominio EAL (PapA), el cual hidroliza al segundo mensajero c-di-GMP (Kanazawa y col., 2010). La segunda arquitectura más encontrada en procariotas es BLUF-EAL, si bien YcgF de *E. coli* posee esta arquitectura, el dominio EAL se encuentra degenerado y no posee actividad fosfodiesterasa de c-di-GMP, pero se demostró que YcgF se une directamente a otra proteína (YcgE) y regula la formación de biofilm (Tschowri y col., 2009). Sin embargo, algunas especies poseen este dominio activo, como se ha demostrado para BlrP1 de *K. pneumoniae* (Barends y col., 2009). Además, existen otras nueve arquitecturas que se encuentran en algunos pocos organismos procariotas. Dentro de estas vale la pena destacar a la proteína AppA de *R. sphaeroides*, la cual posee un dominio BLUF y un dominio SCHIC y es capaz de controlar la expresión de genes de la fotosíntesis en función de la luz azul y la tensión de oxígeno (Gomelsky y Kaplan, 1998; Gomelsky y Klug, 2002).

Dentro de las proteínas LOV procariotas existen pocos fotorreceptores cortos, mientras que más del 50% de los mismos responde a una arquitectura del tipo LOV-HK (Losi y Gartner, 2008) (Figura 17B). En *B. abortus* un fotorreceptor de tipo LOV-HK participa en la regulación de la infección a macrófagos (Swartz y col., 2007), mientras que en *C. crescentrus* su fotorreceptor LOV-HK interacciona con un dominio regulador de respuesta (RR) para modular su adhesión a las superficies en función de la luz azul (Purcell y col., 2007). Existen organismos que poseen su RR fusionado al dominio fotorreceptor, como es el caso de *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas axonopodis* pv. citri (Cao y col., 2008; Kraiselburd y col., 2012). La proteína YtvA de *Bacillus subtilis*, formada por un dominio LOV y un dominio STAS, forma parte de un complejo protéico (estresosoma) que regula la actividad del factor Sigma B en la respuesta al estrés. Cuando YtvA percibe la luz azul, se desencadena una señalización que produce la activación del factor Sigma B y la consecuente activación del regulón Sigma B, el cual está constituido por genes de respuesta al estrés energético y estrés ambiental (Ávila-Pérez y col., 2006). Otra arquitectura ampliamente distribuida en procariotas comprende la unión de dominios LOV con dominios con función diguanilato ciclasas (GGDEF) y fosfodiesterasas (EAL), cuyas actividades determinarían el nivel del segundo mensajero c-di-GMP. Además, algunas proteínas se componen de dominios LOV unidos a un regulador transcripcional de tipo hélice-giro-hélice (HtH) y pueden no poseer dominios efectores, como es el caso de las proteínas conteniendo LOV en *P. putida* (Krauss y col., 2005).



**Figura 17. Arquitectura de las proteínas BLUF y LOV en procariontas. A.** Arquitectura de proteínas BLUF y ejemplos de organismos en los que se encuentran. **B.** Arquitectura de proteínas LOV y ejemplos de organismos en los que se encuentran. EAL: dominio con una secuencia conservada con actividad fosfodiesterasa de c-di-GMP. Ciclasa: adelinato/guanilato ciclasa. GGDEF: dominio con secuencia conservada con actividad diguanilato ciclasa para la síntesis de c-di-GMP. PsiE: *Phosphate-starvation-inducible E*. Pyr redox: oxidoreductasa de piridina. cNB: dominio de union a nucleótido cíclico. HtH: Hélice-giro-helice. SCHIC: *Sensor Containing Heme Instead of Cobalamin*. RRF: *Ribosome recycling factor*. HK: histidin-quinasa. RR: regulador de respuesta. STAS: *Sulfate transporter anti-sigma factor antagonist*. Adaptado de Losi y Gartner, 2008.

A fin de comprender la importancia de las proteínas BLUF dentro del dominio Bacteria analizamos tanto la distribución dentro del dominio, como las diferentes arquitecturas y la frecuencia con la que se encuentran en los distintos organismos. Se comenzó por un análisis general a fin de comprender el contexto en el cual se encuentran estos fotorreceptores en las bacterias quimiotróficas, y se continuó con un análisis particular en miembros del género *Acinetobacter*.

## OBJETIVOS

Los objetivos específicos de este capítulo son:

- **Análisis de la distribución de las proteínas BLUF en bacterias: distribución en filos y en bacterias fototróficas y quimiotróficas**
- **Análisis de las distintas arquitecturas y frecuencia de las proteínas BLUF en bacterias quimiotróficas**
- **Estudio de proteínas BLUF en el género *Acinetobacter*: distribución, frecuencia y filogenia**

## MATERIALES Y MÉTODOS

En todos los casos las secuencias proteicas fueron obtenidas de la base de datos UniProtKB (Schneider y col., 2004), los alineamientos se realizaron utilizando Clustal W (Thompson y col., 1994) y se evaluó el grado de avance en la secuenciación de los genomas en la base de datos del NCBI (NCBI-Resource-Coordinators, 2012).

**Búsqueda de Bacterias con secuencias codificantes para proteínas BLUF putativas y análisis de datos.** Para la búsqueda de todas las proteínas BLUF pertenecientes al dominio Bacteria se utilizó el pfam correspondiente al dominio BLUF (PF04940). Los organismos con genomas completamente secuenciados que poseían secuencias codificantes para BLUF fueron clasificados en cuanto a su fuente de energía en quimiotróficos y fototróficos, considerando el término estricto de quimiotróficos como aquellos organismos incapaces de tomar energía de la luz. Los dominios proteicos fueron detectados mediante el servicio de InterProScan del EBI (Hunter y col., 2009). La información se actualizó al día 4 de Febrero de 2013.

**Alineamiento de proteínas y análisis filogenético.** Las cuatro secuencias correspondientes a proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 (ACIAD1499, ACIAD2110, ACIAD2125 y ACIAD2129) y la región N-terminal (1-125) de AppA de *R. sphaeroides* fueron sujetas a un alineamiento múltiple y se analizó la estructura secundaria mediante el programa de predicción Porter (<http://distill.ucd.ie/porter/>). Para el análisis filogenético se seleccionaron secuencias correspondientes a los dominios BLUF (PF04940) pertenecientes a gammaproteobacterias con sus genomas completamente secuenciados, se alinearon y se construyeron árboles con el método *Neighbour-joining* utilizando el programa MEGA5 (Tamura y col., 2011) y el modelo de sustitución de aminoácidos *Jones-Taylor-Thornton* (JTT) con una distribución gamma de 0.8. La confianza de los árboles de *Neighbour-joining* fue determinada por el análisis de 1000 replicados *bootstrap*. Al analizar los datos con otros métodos (*Maximum Likelihood* y *Minimal Evolution*) se obtuvieron árboles con idéntica topología.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Distribución de proteínas BLUF en bacterias

Debido al incremento del número de genomas procariotas secuenciados y a que el último análisis de la distribución de dominios BLUF fue llevado a cabo hace cinco años (Losi y Gartner, 2008), se propuso actualizar la información correspondiente a la distribución de este fotorreceptor en Bacterias.

#### 1.1. Distribución de proteínas BLUF en filos bacterianos

En la actualidad existe un total de 2409 bacterias con genomas completamente secuenciados, de las cuales un 8,75% poseen secuencias codificantes para proteínas BLUF putativas. El análisis de la distribución de las proteínas conteniendo BLUF en los filos bacterianos se muestra en la Figura 18.

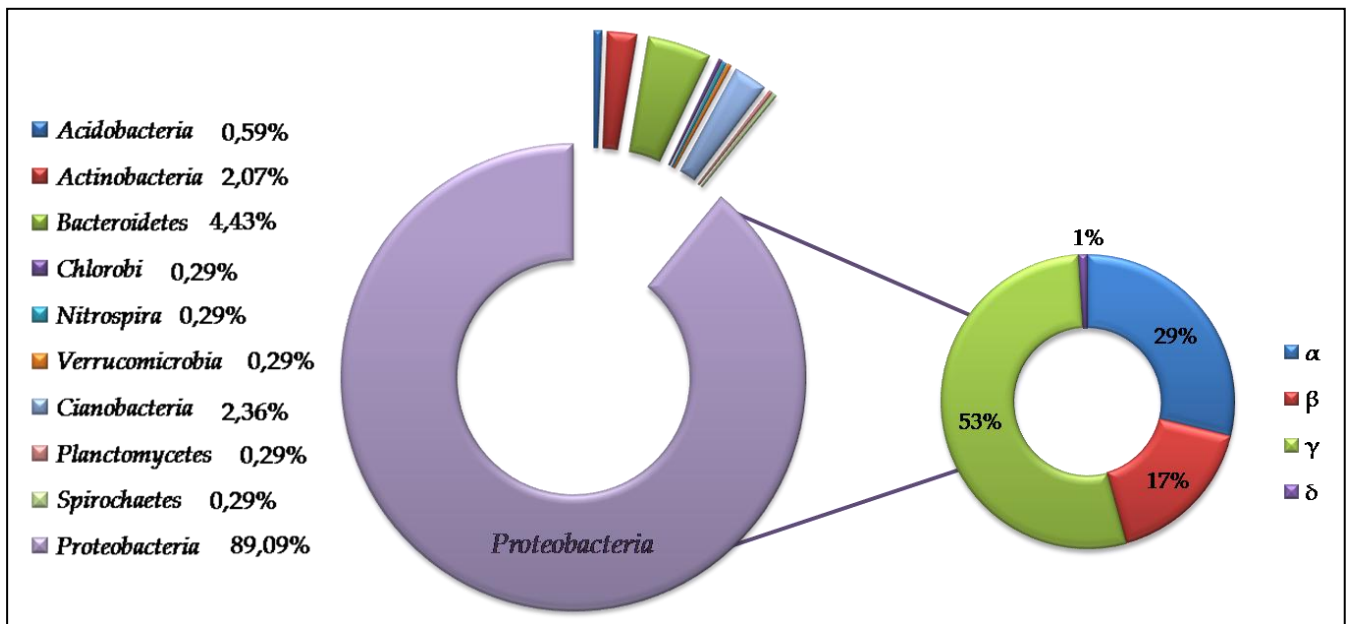
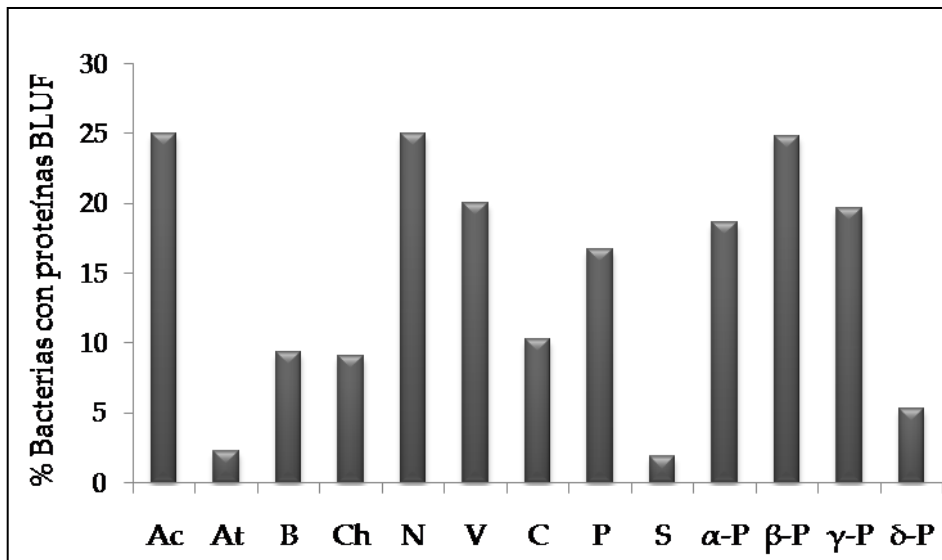


Figura 18. Porcentaje de proteínas BLUF en los filos bacterianos. Porcentaje de un total de 339 proteínas BLUF presentes en bacterias con genomas completamente secuenciados. Del total de dominios BLUF presentes en el filo proteobacteria (302 dominios BLUF) se muestra la distribución en sus clases ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ).

Los resultados muestran que la mayor parte de las proteínas BLUF se encuentran en el filo *Proteobacteria* (89,09%), particularmente en las gammaproteobacterias (47,49% del total de dominios BLUF). Además, se muestra la presencia de dominios BLUF en bacterias pertenecientes a los filos *Actinobacteria*, *Chlorobi*, *Nitrospira*, *Verrumicrobia* y *Spirochaetes*, lo cual no había sido reportado anteriormente.

Es destacable también la redundancia de estos dominios, pues un mismo organismo puede presentar una o más secuencias codificantes para proteínas BLUF, de hecho el total de 339 proteínas BLUF putativas identificadas se encuentran distribuidas en 211 bacterias. Por otra parte, se analizó el porcentaje de bacterias que poseen proteínas BLUF de los distintos filos, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 19.

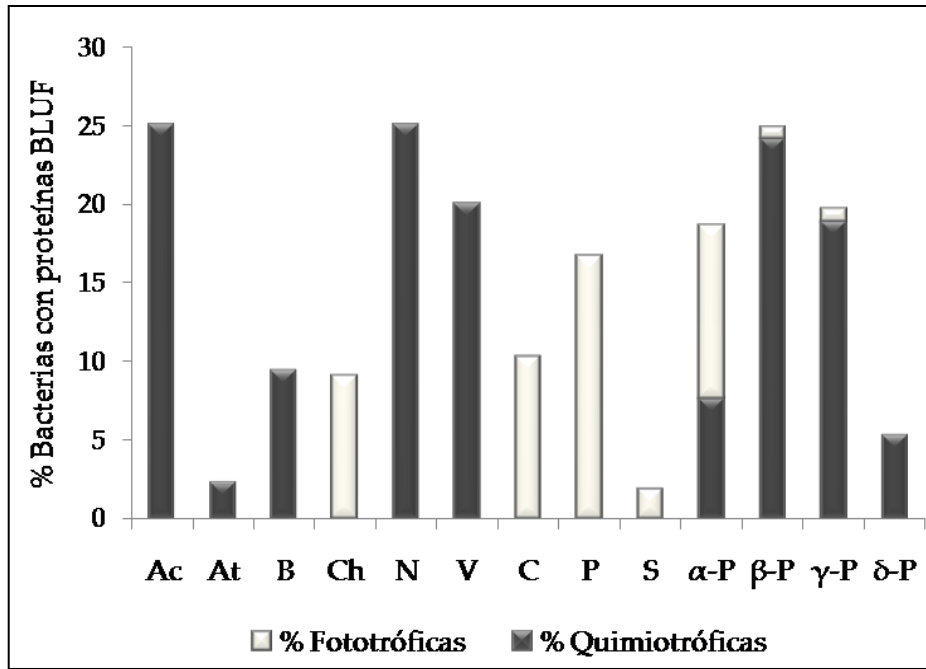


**Figura 19. Distribución de bacterias con secuencias codificantes para proteínas BLUF dentro de los filos bacterianos.** El filo *Proteobacteria* se separó en sus clases ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ). Para cada filo el número total de bacterias completamente secuenciadas es: *Acidobacteria* (Ac): 8, *Actinobacteria* (At): 267, *Bacteroidetes* (B): 96, *Chlorobi* (Ch): 11, *Nitrospira* (N): 4, *Verrucomicrobia* (V): 5, *Cyanobacteria* (C): 78, *Planctomycetes* (P): 6, *Spirochaetes* (S): 54,  $\alpha$ -*Proteobacteria* ( $\alpha$ -P): 236,  $\beta$ -*Proteobacteria* ( $\beta$ -P): 137,  $\gamma$ -*Proteobacteria* ( $\gamma$ -P): 508 y  $\delta$ -*Proteobacteria* ( $\delta$ -P): 57.

Si bien los porcentajes correspondientes a Ac, N, V y P son altos, debe considerarse el bajo número de bacterias completamente secuenciadas. Por otra parte, el importante aumento del número de bacterias secuenciadas en el filo *Proteobacteria* trajo aparejado un aumento del porcentaje de bacterias con secuencias codificantes para proteínas BLUF en las  $\alpha$ -P,  $\beta$ -P y  $\gamma$ -P con respecto a lo previamente reportado, donde los porcentajes de estas no alcanzaban el 1% (Losi y Gartner, 2008).

## 1.2. Distribución de proteínas BLUF en bacterias fototróficas y quimiotróficas

Con el fin de establecer si los dominios BLUF participarían en la regulación de respuestas a la luz azul tanto en bacterias fototróficas como quimiotróficas, se evaluó la distribución de las proteínas BLUF en ambos grupos microbianos (Figura 20).



**Figura 20. Distribución de bacterias quimiotróficas y fototróficas con secuencias codificantes para proteínas BLUF dentro de los filos bacterianos.** El filo Proteobacteria se separó en sus clases ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ). Para cada filo el número total de bacterias completamente secuenciadas es: *Acidobacteria* (Ac): 8, *Actinobacteria* (At): 267, *Bacteroidetes* (B): 96, *Chlorobi* (Ch): 11, *Nitrospira* (N): 4, *Verrucomicrobia* (V): 5, *Cyanobacteria* (C): 78, *Planctomycetes* (P): 6, *Spirochaetes* (S): 54,  $\alpha$ -*Proteobacteria* ( $\alpha$ -P): 236,  $\beta$ -*Proteobacteria* ( $\beta$ -P): 137,  $\gamma$ -*Proteobacteria* ( $\gamma$ -P): 508 y  $\delta$ -*Proteobacteria* ( $\delta$ -P): 57.

Si bien estos resultados provienen del análisis de secuencias genómicas, y la función como fotorreceptores de la mayor parte de estas proteínas putativas no ha sido evaluada, la distribución encontrada sugiere que de todas las bacterias que poseen secuencias codificantes para proteínas BLUF putativas, el 80,09% corresponde a bacterias quimiotróficas, mientras que sólo el 19,91% restante corresponde a bacterias fototróficas. La mayor frecuencia de proteínas BLUF en bacterias quimiotróficas con respecto a fototróficas ha sido un resultado sorprendente al cual todavía no se le ha encontrado una clara explicación.

### 1.2.1. Arquitectura y número de proteínas BLUF en bacterias quimiotróficas

Todas las bacterias quimiotróficas con genoma completamente secuenciado que poseen secuencias codificantes para proteínas BLUF fueron evaluadas en cuanto al número y arquitectura de las proteínas BLUF. La Tabla 7 muestra que las bacterias quimiotróficas presentan cinco arquitecturas posibles de proteínas BLUF: BLUF cortas, BLUF-EAL, BLUF-GC, PAS-GGDEF-EAL-BLUF (denominada arquitectura "A") y BLUF-PAS-PAS-PAS-GGDEF (denominada arquitectura "B"). Como se esperaba la arquitectura más encontrada fue la de BLUF corta, seguida por BLUF-EAL,

las que se encontraron en el 67,4% y 30,7% de las proteínas BLUF de bacterias quimiotróficas, respectivamente. Mientras que la distribución de las proteínas con arquitectura BLUF corta fue homogénea, las proteínas con arquitectura BLUF-EAL se encontraron principalmente en el filo *Gamaproteobacteria*, en los organismos pertenecientes a los órdenes *Enterobacteriales* y *Alteromonadales*. La arquitectura "A" se encontró en tres bacterias que también poseían proteínas con arquitectura BLUF corta; *Magnetococcus* sp. MC-1, *Methylomicrobium alcaliphilum* DSM 19304 y *Methylomonas methanica* MC09. Las arquitecturas BLUF-GC y "B" fueron encontradas (separadamente) en un único organismo, en efecto mientras que la primera se encontró en un miembro del filo *Spirochaetaes* (*Turneriella parva* ATCC BAA-1111), la segunda se encontró en la gammaproteobacteria *Legionella longbeachae* sergr 1 NSW150.

Al analizar el número de proteínas BLUF dentro de la misma bacteria (frecuencia) se observó una gran variabilidad, encontrándose bacterias conteniendo de 1 a 7 proteínas con arquitectura BLUF corta y de 1 a 3 proteínas con arquitectura BLUF-EAL. La Tabla 8 muestra la frecuencia de proteínas BLUF en bacterias quimiotróficas. Si bien el mayor porcentaje de bacterias poseen una única proteína BLUF, la presencia de dos o más fotorreceptores no es un hecho excepcional. Es importante resaltar que bacterias estrechamente relacionadas, pertenecientes al mismo género (por ejemplo *Acinetobacter*) o incluso a la misma especie (*Stenotrophomonas maltophilia*) difieren en el número de fotorreceptores que contienen.

**Tabla 7. Número y arquitectura de proteínas BLUF en bacterias quimiótroficas**

| Filo                                    | Bacterias  | BLUF   | Arq.   | Filo  | Bacterias  | BLUF   | Arq.       |          |
|---|--|--|--|---|--|--|------------|----------|
| <b>Ac</b>                               | <i>Terriglobus saanensis</i> ATCC BAA-1853                             | 1  | BLUF corta                                   | <b>γ-P</b>  | <i>Acinetobacter baumannii</i> / 10 cepas                    | 1  | BLUF corta |          |
|   | <i>Solibacter usitatus</i> Ellin6076                                   | 1  | BLUF corta                                   |   | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> PHEA-2                    | 2  | BLUF corta |          |
| <b>At</b>                               | <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> CTCB07                        | 1  | BLUF corta                                   |   | <i>Acinetobacter radioresistens</i> WC-A-157                 | 5  | BLUF corta |          |
|   | <i>Microbacterium testaceum</i> StLB037                                | 1  | BLUF corta                                   |   | <i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1                             | 4  | BLUF corta |          |
|   | <i>Corynebacterium efficiens</i> YS-314                                | 1  | BLUF corta                                   |   | <i>Acinetobacter oleivorans</i> DR1                          | 2  | BLUF corta |          |
|   | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> ATCC 33113  | 2  | BLUF corta                                   |   | <i>Alteromonas macleodii</i> / 5 cepas                       | 1  | BLUF-EAL   |          |
|   | <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> NCPPB 382 | 2  | BLUF corta                                   |   | <i>Citrobacter rodentium</i> ICC168                          | 1  | BLUF-EAL   |          |
|   | <i>Aequorivita sublithincola</i> DSM 14238                             | 1  | BLUF corta                                   |   | <i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC BAA-894                    | 2  | BLUF-EAL   |          |
|   | <i>Cellulophaga algicola</i> DSM 14237                                 | 1  | BLUF corta                                   |   | <i>Cronobacter sakazakii</i> ES15                            | 1  | BLUF-EAL   |          |
| <b>B</b>                                | <i>Gramella forsetii</i> KT0803  | 1  | BLUF corta                                   |   | <i>Cronobacter turicensis</i> DSM 18703                      | 2  | BLUF-EAL   |          |
|   | <i>Krokinobacter</i> sp. 4H-3-7-5                                      | 2  | BLUF corta                                   |   | <i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048                     | 1  | BLUF-EAL   |          |
|   | <i>Marivirga tractuosa</i> ATCC 23168                                  | 1  | BLUF corta                                   |   | <i>Enterobacter asburiae</i> LF7a                            | 2  | BLUF-EAL   |          |
|   | <i>Mucilaginibacter paludis</i> DSM 18603                              | 4  | BLUF corta                                   |   | <i>Enterobacter cloacae</i> NCTC 9394                        | 1  | BLUF-EAL   |          |
|   | <i>Spirosoma linguale</i> ATCC 33905                                   | 2  | BLUF corta                                   |   | <i>Enterobacter cloacae</i> EcWSU1                           | 2  | BLUF-EAL   |          |
|   | <i>Zobellia galactanivorans</i> DSM 12802                              | 2  | BLUF corta                                   |   | <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047 | 1  | BLUF-EAL   |          |
|   | <i>Zunongwangia profunda</i> DSM 18752                                 | 1  | BLUF corta                                   |   | <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ENHKU01    | 3  | BLUF-EAL   |          |
|   | <b>N</b>   | <i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>        | 1  |   | BLUF corta   | <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> DSM | 2          | BLUF-EAL |
|   |  | <i>Coralimargarita akajimensis</i> DSM 45221 | 1  |   | BLUF corta   | <i>Enterobacter</i> sp. 638                              | 2          | BLUF-EAL |
|   | <b>P</b>   | <i>Rhodopirellula baltica</i> SH1            | 1  |   | BLUF corta   | <i>Erwinia billingiae</i> Eb661                          | 1          | BLUF-EAL |
| <b>S</b>                                | <i>Turneriella parva</i> ATCC BAA-1111                                 | 2  | BLUF- GC                                     |   | <i>Erwinia tasmaniensis</i> DSM 17950                        | 1  | BLUF-EAL   |          |
| <b>α-P</b>                              | <i>Brevundimonas subvibrioides</i> ATCC 15264                          | 5  | BLUF corta                                   | <i>Escherichia coli</i> / 20 cepas                              | 1  | BLUF-EAL   |            |          |
|   | <i>Phenyllobacterium zucineum</i> HLK1                                 | 2  | BLUF corta                                   | <i>Frateuria aurantia</i> ATCC 33424                            | 2  | BLUF-EAL   |            |          |
|   | <i>Methylocystis</i> sp. SC2   | 1  | BLUF corta                                   | <i>Glaciecola nitratireducens</i> JCM 12485                     | 1  | BLUF corta   |            |          |
|   | <i>Methylobacterium chloromethanicum</i> CM4                           | 1  | BLUF corta                                   | <i>Kangiella koreensis</i> DSM 16069                            | 1  | BLUF corta   |            |          |
|   | <i>Methylobacterium nodulans</i> ORS2060                               | 1  | BLUF corta                                   | <i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724                             | 2  | BLUF-EAL   |            |          |
|   | <i>Parvibaculum lavamentivorans</i> DS-1                               | 1  | BLUF corta                                   | <i>Klebsiella oxytoca</i> E718                                  | 2  | BLUF-EAL   |            |          |
|   | <i>Pseudovibrio</i> sp. FO-BEG1  | 1  | BLUF corta                                   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2242                          | 1  | BLUF-EAL   |            |          |
|   | <i>Hyphomonas neptunium</i> ATCC 15444                                 | 1  | BLUF corta                                   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2243                          | 1  | BLUF-EAL   |            |          |
|   | <i>Silicibacter</i> sp. TM1040   | 2  | BLUF corta                                   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> 342                                | 2  | BLUF-EAL   |            |          |
|   | <i>Roseobacter litoralis</i> ATCC 49566                                | 1  | BLUF corta                                   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> / 3 cepas | 2  | BLUF-EAL   |            |          |
| <i>Maricaulis maris</i> MCS10           | 2  | BLUF corta                                   | <i>Klebsiella variicola</i> At-22            | 2   | BLUF-EAL   |  |            |          |
| <i>Azospirillum lipoferum</i> 4B        | 2  | BLUF corta                                   | <i>Legionella longbeachae</i> sergr 1 NSW150 | 1   | "B"  |  |            |          |
| <i>Sphingobium chlorophenolicum</i> L-1 | 1  | BLUF corta                                   | <i>Marinobacter adhaerens</i> HP15           | 2   | BLUF corta   |  |            |          |
| <i>Sphingomonas wittichii</i> RW1       | 1  | BLUF corta                                   | <i>Marinobacter aquaeolei</i> ATCC 700491    | 1   | BLUF corta   |  |            |          |

Tabla 7. Continuación

| Filo  | Bacterias                                     | BLUF       | Arq.   | Filo   | Bacterias  | BLUF       | Arq.                     |
|---|---|------------|--|--|--|------------|--------------------------|
| $\alpha$ -P                                   | <i>Sphingobium japonicum</i> NBRC 101211      | 1          | BLUF corta                                     | $\gamma$ -P                                  | <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ATCC 49840 | 1          | BLUF corta               |
|   | <i>Sphingopyxis alaskensis</i> DSM 13593      | 1          | BLUF corta                                     |  | <i>Marinomonas mediterranea</i> ATCC 700492          | 2          | BLUF corta               |
|   | <i>Polymorphum gilvum</i> LMG 25793           | 1          | BLUF corta                                     |  | <i>Marinomonas posidonica</i> CECT 7376              | 1          | BLUF corta               |
|   | <i>Magnetococcus</i> sp. MC-1                 | 3          | 2 BLUF corta<br>1 "A"                          |  | <i>Marinomonas</i> sp. MWYL1                         | 1          | BLUF corta               |
| $\beta$ -P                                    | <i>Acidovorax avenae</i> ATCC 19860           | 2          | BLUF corta                                     |  | <i>Methylomicrobium alcaliphilum</i> DSM 19304       | 4          | 3 BLUF<br>corta<br>1 "A" |
|   | <i>Acidovorax citrulli</i> AAC00-1            | 2          | BLUF corta                                     |  | <i>Methylomonas methanica</i> MC09                   | 3          | 2 BLUF<br>corta<br>1 "A" |
|   | <i>Acidovorax ebreus</i> TPSY                 | 1          | BLUF corta                                     |  | <i>Pantoea ananatis</i> / 4 cepas                    | 2          | BLUF-EAL                 |
|   | <i>Acidovorax</i> sp. KKS102                  | 3          | BLUF corta                                     |  | <i>Pantoea</i> sp. At-9b                             | 2          | BLUF-EAL                 |
|   | <i>Alicyclophilus denitrificans</i> DSM 14773 | 1          | BLUF corta                                     |  | <i>Pantoea vagans</i> C9-1                           | 3          | BLUF-EAL                 |
|   | <i>Alicyclophilus denitrificans</i> JCM 14587 | 1          | BLUF corta                                     |  | <i>Pseudoalteromonas atlantica</i> T6c               | 2          | BLUF corta               |
|   | <i>Bordetella avium</i> 197N                  | 1          | BLUF-EAL                                       | <i>Pseudoalteromonas</i> sp. SM9913          | 1  | BLUF corta |                          |
|   | <i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003              | 1          | BLUF corta                                     | <i>Psychrobacter arcticus</i> DSM 17307      | 1  | BLUF corta |                          |
|   | <i>Burkholderiales bacterium</i> JOSHI_001    | 4          | BLUF corta                                     | <i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5       | 3  | BLUF corta |                          |
|   | <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472   | 1          | BLUF corta                                     | <i>Psychrobacter</i> sp. PRwf-1              | 2  | BLUF corta |                          |
|   | <i>Cupriavidus necator</i> ATCC 17699         | 1          | BLUF corta                                     | <i>Psychromonas ingrahamii</i> 37            | 1  | BLUF corta |                          |
|   | <i>Cupriavidus necator</i> N-1                | 1          | BLUF corta                                     | <i>Rahnella aquatilis</i> HX2                | 1  | BLUF-EAL   |                          |
|   | <i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134      | 1          | BLUF corta                                     | <i>Rahnella</i> sp. Y9602                    | 1  | BLUF-EAL   |                          |
|   | <i>Cupriavidus taiwanensis</i> R1             | 1          | BLUF corta                                     | <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1            | 1  | BLUF corta |                          |
|   | <i>Delftia acidovorans</i> DSM 14801          | 1          | BLUF corta                                     | <i>Shewanella woodyi</i> ATCC 51908          | 1  | BLUF corta |                          |
|   | <i>Delftia</i> sp. Cs1-4                      | 1          | BLUF corta                                     | <i>Shigella sonnei</i> 53G                   | 1  | BLUF corta |                          |
|   | <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1        | 1          | BLUF corta                                     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> K279a    | 6  | BLUF corta |                          |
|   | <i>Hermiimonas arsenicoxydans</i>             | 1          | BLUF corta                                     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> R551-3   | 2  | BLUF corta |                          |
|   | <i>Leptothrix cholodnii</i> ATCC 51168        | 1          | BLUF corta                                     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> D457     | 7  | BLUF corta |                          |
|   | <i>Methylbium petroleiphilum</i> PM1          | 2          | BLUF corta                                     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> JV3      | 3  | BLUF corta |                          |
| <i>Methylotenera mobilis</i> JLW8             | 1   | BLUF corta | <i>Vibrio splendidus</i> LGP32                 | 1  | BLUF corta   |            |                          |
| <i>Polaromonas naphthalenivorans</i> CJ2      | 2   | BLUF corta | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citri 306    | 2  | BLUF corta   |            |                          |
| <i>Polaromonas</i> sp. JS666                  | 2   | BLUF corta | <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. citrumelo F1 | 1  | BLUF corta   |            |                          |
| <i>Polynucleobacter necessarius</i> STIR1     | 1   | BLUF corta | $\delta$ -P                                    | <i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01  | 1  | BLUF corta |                          |
| <i>Polynucleobacter</i> sp. QLW-P1DMWA-1      | 1   | BLUF corta |  | <i>Desulfococcus oleovorans</i> DSM 6200     | 1  | BLUF corta |                          |
| <i>Ralstonia metallidurans</i> CH34           | 1   | BLUF corta |  | <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> ATCC 15356 | 1  | BLUF corta |                          |
| <i>Ramlibacter tataouinensis</i> ATCC BAA-407 | 3   | BLUF corta |  |  |  |            |                          |
| <i>Rhodoferax ferrireducens</i> DSM 15236     | 1   | BLUF corta |  |  |  |            |                          |
| <i>Thiobacillus denitrificans</i> ATCC 25259  | 1   | BLUF corta |  |  |  |            |                          |
| <i>Thiomonas intermedia</i> K12               | 1   | BLUF corta |  |  |  |            |                          |
| <i>Variovorax paradoxus</i> EPS               | 3   | BLUF corta |  |  |  |            |                          |
| <i>Variovorax paradoxus</i> S110              | 2   | BLUF corta |  |  |  |            |                          |
| <i>Verminephrobacter eiseniae</i> EF01-2      | 2   | BLUF corta |  |  |  |            |                          |

Arq.: arquitectura, Ac: Acidobacteria, At: Actinobacteria, B: Bacteroidetes, N: Nitrospirae, V: Verrucomicrobia, P: Planctomycetes, S: Spirochaetes,  $\alpha$ -P: Alfaproteobacteria,  $\beta$ -P: Betaproteobacteria,  $\gamma$ -P: Gammaproteobacteria,  $\delta$ -P: Deltaproteobacteria, GC: guanilato ciclasa, sergr: serogrupo, "A": PAS-GGDEF-EAL-BLUF, "B": BLUF-PAS-PAS-PAS-GGDEF.

**Tabla 8. Porcentaje de bacterias quimiotróficas de acuerdo a la frecuencia de proteínas BLUF**

| Arquitectura               | Número de proteínas BLUF dentro de la misma bacteria (frecuencia) |            |          |          |          |          |          |
|----------------------------|---|------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                            | 1   | 2          | 3        | 4        | 5        | 6        | 7        |
| BLUF corta (112 bacterias) | 73 (65,2%)  | 26 (23,2%) | 6 (5,4%) | 3 (2,7%) | 2 (1,8%) | 1 (0,9%) | 1 (0,9%) |
| BLUF-EAL (58 bacterias)    | 37 (63,8%)  | 19 (32,8%) | 2 (3,4%) | -        | -        | -        | -        |

## 2. Proteínas BLUF en el género *Acinetobacter*

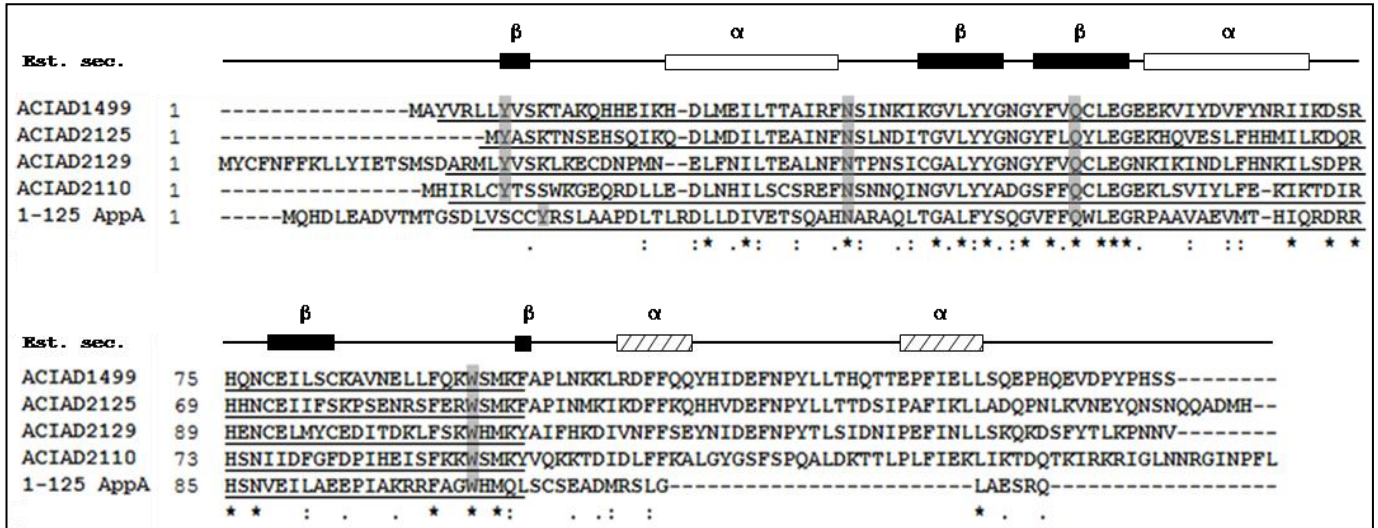
La mayor parte de los fotorreceptores de luz azul descritos para bacterias quimiotróficas están compuestos por una combinación de dominios que sugieren su función. Como se mencionó anteriormente, algunos ejemplos son el antirrepresor YcgF (BLUF-EAL) de *E. coli* (Tschowri y col., 2009), Ytva (LOV-STAS) de *B. subtilis* (Ávila-Pérez y col., 2006), LOV-HK de *C. crescentrus* (Purcell y col., 2007) y del patógeno humano/animal *B. abortus* (Swartz y col., 2007). Sin embargo, este no es el caso de las cinco especies completamente secuenciadas del género *Acinetobacter*, cuyos genomas poseen secuencias codificantes para proteínas BLUF con arquitectura BLUF corta, que consisten en un dominio BLUF (PF04940) junto a un C-terminal de aproximadamente 55 aminoácidos, similar a la encontrada en PixD de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Yuan y Bauer, 2008) y PapB de *Rhodopseudomonas palustris* (Kanazawa y col., 2010). En este último caso, la formación de biofilm es regulada de manera dependiente de la luz azul a través de la modificación del nivel de c-di-GMP mediante la interacción proteína-proteína en un complejo formado por la proteína BLUF corta (PapB) y una proteína conteniendo EAL (PapA). Aunque se podría proponer un mecanismo basado en interacción proteína-proteína para las proteínas BLUF del género *Acinetobacter*, hasta el momento esto no ha sido estudiado.

Si bien las cepas correspondientes a *A. baumannii* poseen un único gen codificante para BLUF, los miembros de las otras cuatro especies (*A. calcoaceticus* PHEA-2, *A. radioresistens* WCA157, *A. baylyi* ADP1 y *A. oleivorans* DR1) poseen dos o más genes codificantes para proteínas BLUF putativas. Particularmente *A. baylyi* ADP1 posee cuatro secuencias, las cuales fueron denominadas ACIAD1499, ACIAD2110, ACIAD2125 y ACIAD2129 en la base de datos del NCBI.

La conservación de múltiples secuencias codificantes para proteínas BLUF putativas en miembros del género *Acinetobacter* indica su importancia en cuanto a su función fisiológica en la bacteria. La multiplicidad de secuencias codificantes para proteínas BLUF putativas, junto a las características particulares de *A. baylyi* ADP1 como organismo modelo llevaron a focalizar el estudio de estas proteínas en esta cepa ambiental a fin de evaluar tanto la función de los fotorreceptores, como también el significado de la abundancia de dichos genes.

### 2.1. Alineamiento de las proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1

Con el objetivo de conocer si las cuatro secuencias codificantes para proteínas BLUF en *A. baylyi* ADP1 presentaban los aminoácidos necesarios para interactuar con su cromóforo (FAD), se realizó un alineamiento entre estas secuencias y la región N-terminal de AppA de *R. sphaeroides* cuya función como fotorreceptor había sido demostrada (Gauden y col., 2005) (Figura 21).



**Figura 21. Alineamiento múltiple de proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 y la región N-terminal de AppA de *R. sphaeroides* generado por Clustal W.** Las secuencias ACIAD1499, ACIAD2125, ACIAD2129 y ACIAD2110 corresponden a los números de acceso del UniProt: Q7BC36, Q6FAI1, Q6FAH9 y Q6FAJ5, respectivamente. La región N-terminal de AppA de *R. sphaeroides* comprende a los aminoácidos 1 al 125 de AppA (número de acceso de UniProt: Q53119). Se encuentran subrayadas las regiones correspondientes al dominio BLUF (PF04940) y se resaltan los aminoácidos necesarios para la interacción con FAD. Los asteriscos (\*) indican las posiciones que poseen un único y conservado residuo, los dos puntos (:) indican conservación entre grupos con propiedades fuertemente similares, con una puntuación > 0.5 en la matriz Gonnet PAM 250 matrix, y punto (.) indica conservación entre grupos con propiedades débilmente similares, con una puntuación ≤ 0.5 en la matriz Gonnet PAM 250. La estructura secundaria predecida de las proteínas BLUF (Est. sec.) muestra los residuos correspondientes a  $\alpha$  hélices ( $\square$ ) y hojas plegadas  $\beta$  (■) conservadas en los cinco dominios BLUF y dos hojas plegadas  $\beta$  conservadas en las proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 ( $\square$ ).

Los residuos más conservados dentro de las proteínas BLUF son aquellos que se encuentran en la vecindad del sitio de unión a FAD, teniendo particular importancia la tirosina y glutamina (Tyr21 y Gln63 para AppA), ya que son residuos críticos para la reacción a la luz (ver Figura 7). Estudios realizados en AppA demostraron que la Tyr21 está involucrada en el estado de señalización como consecuencia de la transferencia del electrón y protón inducida por la luz desde la tirosina conservada a FAD. La mutación en este residuo impide la formación del estado de señalización (Gauden y col., 2007). Por otro lado, el Gln63 posee un rol fundamental en AppA debido a que su cadena lateral forma puentes de hidrógeno con FAD y su rotación y/o tautomerización son



cruciales en el proceso de fotoactivación. Más aún, tanto la mutante en Gln50 de la proteína BLUF de la cianobacteria *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (Kita y col., 2005) como la mutante en Gln63 de AppA (Dragnea y col., 2010) no fueron capaces de generar el fotociclo. A pesar que el Trp104 de AppA forma parte del bolsillo en el cual se encuentra FAD, la mutante en este residuo produjo el fotociclo y el estado de señalización al igual que la cepa salvaje. Considerando que Trp104 se une por puente de hidrógeno a Gln63 en oscuridad, esta interacción no sería necesaria para la formación del estado de señalización del fotorreceptor (Gauden y col., 2007). Estudios posteriores confirmaron que el microambiente de Trp104 no sufre modificaciones importantes entre los estados de luz y oscuridad de AppA (Toh y col., 2008). El residuo de Asn45 interacciona mediante dos puentes de hidrógeno con FAD, lo cual explica su alto grado de conservación, pero este residuo no participaría en la reacción de fotoactivación.

El alineamiento mostrado en la Figura 21 demostró que si bien existe un bajo porcentaje de identidad entre las cuatro secuencias correspondientes a proteínas BLUF putativas de *A. baylyi* ADP1 (36 a 55%), las cuatro proteínas poseen los aminoácidos Tyr, Asn, Gln y Trp, que son necesarios para poder interactuar con su cromóforo FAD y desencadenar un fotociclo bajo la incidencia de la luz azul. Además, el análisis predictivo de la estructura secundaria demostró que las cuatro secuencias presentan la estructura tipo ferredoxina característica de los dominios BLUF, constituida por 5 hojas plegadas  $\beta$  y dos  $\alpha$  hélices.

## 2.2. Entorno de las proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1

Para que se produzca una exitosa señalización desencadenada por la luz azul es necesaria la conexión del fotorreceptor con dominios efectores. Debido a que las cuatro proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 poseen una arquitectura BLUF corta y su extremo C-terminal no presenta similitud con ningún motivo estructural (EAL, ciclasa, GGDEF, HTH, RR o STAS) se sugiere que estas proteínas podrían tener una interacción proteína-proteína con su dominio efector. La interacción fotorreceptor-dominio efector fue dilucidada para PapB-PapA de *R. palustris*, donde el gen codificante de la proteína BLUF (PapB) se encuentra río abajo del gen codificante para la proteína conteniendo EAL (PapA) (Kanazawa y col., 2010). Inicialmente, fue la observación de que ambas secuencias codificantes formaban parte del mismo operón lo que permitió proponer la interacción de las proteínas en cuanto a su funcionalidad. Por otro lado, estudios realizados en *A. baumannii* ATCC 17978, cuya única proteína BLUF (BlsA) fue funcionalmente identificada, sugirieron que la región río arriba del gen *blsA*, que codifica para una potencial proteína BOF por

*oligonucleotide/oligosaccharide-binding (OB)-fold*, podría contribuir sinérgicamente a la función de BlsA. A fin de evaluar posibles dominios efectores se analizó el entorno genético de los cuatro genes codificantes para proteínas BLUF en *A. baylyi* ADP1. Mientras que las regiones río arriba y río abajo del gen ACIAD1499 mostraron genes codificantes para MutS y Ferredoxina, respectivamente, el entorno de los otros tres genes correspondían a secuencias codificantes para proteínas putativas de función desconocida, por lo que no ha sido posible establecer una relación funcional de las proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 con otras proteínas al analizar los genes que se encuentran en su contexto genómico.

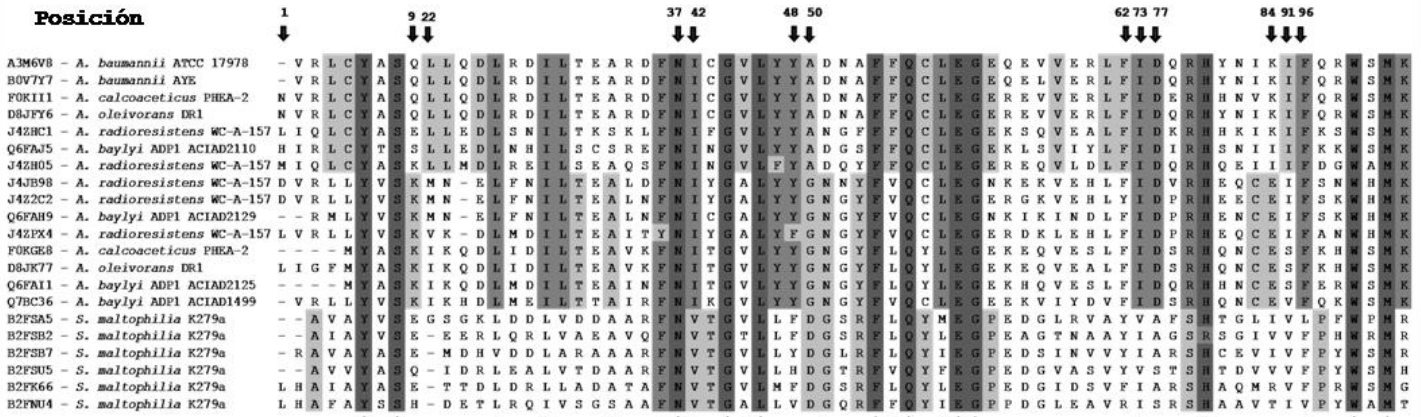
### **2.3. Análisis filogenético de dominios BLUF de *A. baylyi* ADP1 junto a otros miembros de la clase *Gammaproteobacteria***

Con el fin de analizar el origen filogenético de los dominios BLUF de *A. baylyi* ADP1 se realizó un alineamiento múltiple y posterior construcción de un árbol de filogenia junto con dominios BLUF de otros miembros de la clase *Gammaproteobacteria*. Como algunos miembros de dicha clase poseen BLUF complejos, para el análisis sólo se consideró el dominio BLUF (PF04940), el cual consiste entre 90 y 98 aminoácidos. El alineamiento múltiple obtenido para las seis cepas del género *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas maltophilia* K279a se muestra en la Figura 22A., siendo géneros donde la distancia de a pares promedio entre ambos es alta (74,82%). El alineamiento evidenció que once residuos se encontraban altamente conservados (asteriscos), siete de los cuales se mostraron completamente conservados e idénticos a los residuos descritos para un dominio BLUF. Los otros cuatro aminoácidos, Leu46, Phe54, Trp99 y Met101 son generalmente considerados como residuos parcialmente conservados dentro de esta familia de fotorreceptores (Gomelsky y Klug, 2002). En este análisis se muestra que independientemente de la distancia entre ambos géneros todas las secuencias de dominios BLUF conservan aquellos aminoácidos que son considerados esenciales para este fotorreceptor.

El árbol filogenético construido con las secuencias correspondientes a los dominios BLUF de miembros del género *Acinetobacter* y otras gammaproteobacterias realizado mediante el modelo de *Neighbor joining* se muestra en la Figura 22.B. Las seis secuencias correspondientes a *S. maltophilia* K279a (Grupo S) presentaron un origen único (monofilético), mientras que los dominios BLUF codificados en los genomas de los miembros de *Acinetobacter* (Grupo A) se encontraron divididos en dos ramas, los sub-grupos AI y AII, soportado por un valor de *bootstraap* de 66%, lo cual puede

sugerir dos orígenes distintos o un evento de duplicación previo a la especiación. Es importante resaltar, que las secuencias correspondientes a los dominios BLUF de *A. baylyi* ADP1 presentaron una distribución que difiere de la esperada de acuerdo a la especiación, donde ACIAD2110 corresponde al sub-grupo AI junto a la especie *A. baumannii*, mientras los otros tres dominios BLUF (ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129) pertenecen al sub-grupo AII. Los cálculos de la distancia de a pares promedio dentro del grupo A y grupo S fueron de 47,57% y 49,99%, respectivamente, lo que sugirió que las diferencias encontradas entre las secuencias dentro de cada uno de los grupos podría adjudicarse a la tasa de mutación como consecuencia de la evolución. Por otro lado, la presencia de dominios BLUF pertenecientes a la misma especie del género *Acinetobacter* en distintas sub-grupos (AI y AII) podría ser producto de la duplicación del gen codificante en un ancestro común seguido de mutaciones al azar en los genes resultantes. Esto puede observarse en las especies *A. baylyi*, *A. oleivorans*, *A. calcoaceticus* y *A. radioresistens*, todas las cuales presentan múltiples dominios BLUF y estos se distribuyen en ambos sub-grupos. En cambio es distinto el caso de *A. baumannii*, para el cual debería considerarse la hipótesis de la posible pérdida de uno o varios genes a fin de explicar la presencia de un único dominio BLUF en esta especie.

**A**



**B**

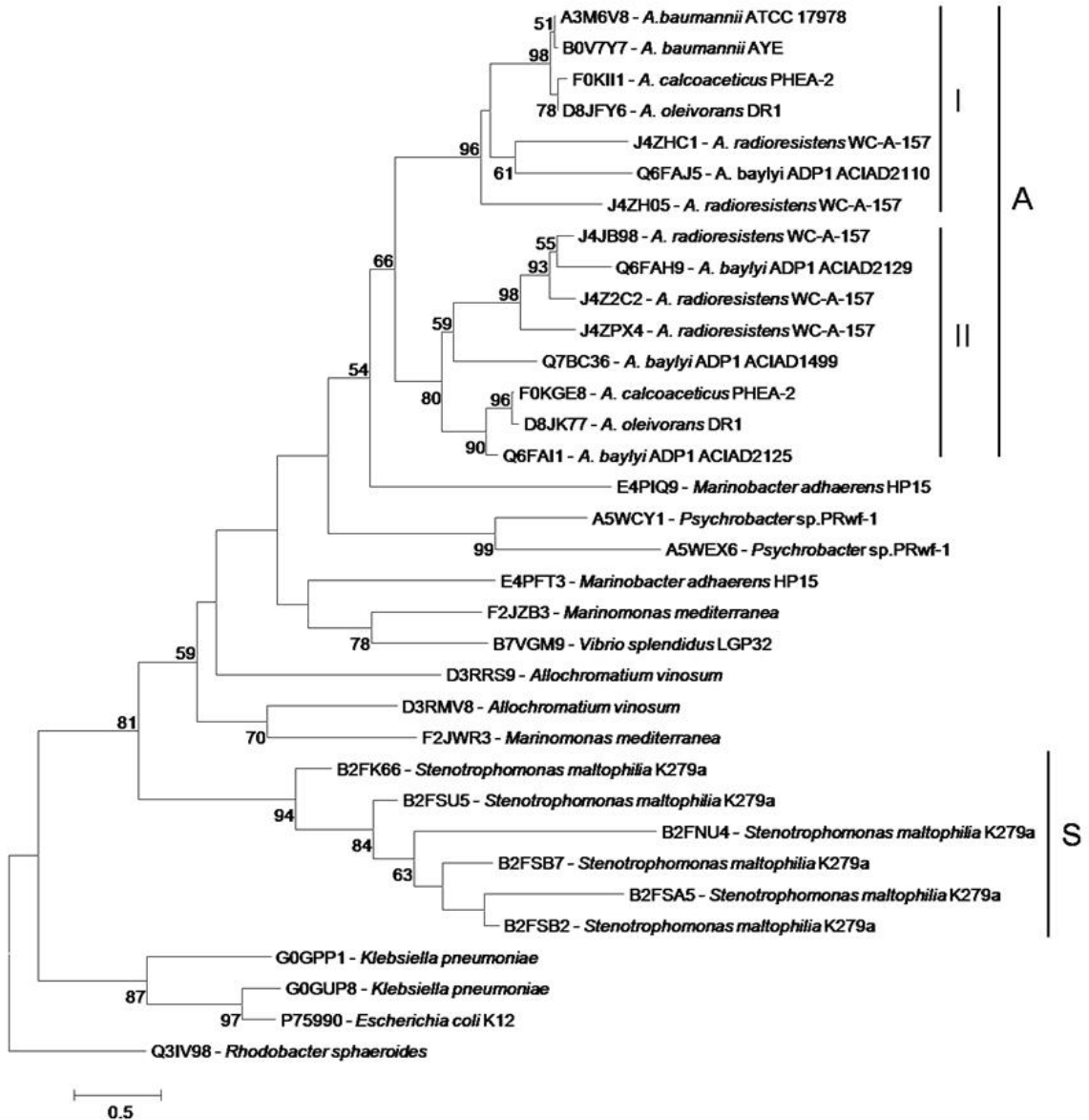


Figura 22. Alineamiento múltiple de dominios BLUF putativos y árbol filogenético de algunos miembros de la clase *Gammaproteobacteria*. A. Alineamiento múltiple de dominios BLUF putativos (PF04940) de miembros del género *Acinetobacter* y *Stenotrophomonas maltophilia* K279a generado por ClustalW y posterior ajuste manual. Los nombres de las especies se muestran con el número de acceso de Uniprot. Las flechas indican las posiciones del alineamiento, donde las posiciones de 10 a 21, 38 a

41, 49, 63 a 72, 74 a 76, 85 a 90 y 92 a 95 correspondían a sitios no informativos y fueron removidas para la figura. Los asteriscos (\*) indican las posiciones que poseen un único y conservado residuo, los dos puntos (:) indican conservación entre grupos con propiedades fuertemente similares, con una puntuación > 0.5 en la matriz Gonnet PAM 250 matrix, y punto (.) indica conservación entre grupos con propiedades débilmente similares, con una puntuación ≤ 0.5 en la matriz Gonnet PAM 250. **B.** Árbol filogenético de dominios BLUF de miembros de la clase *Gammaproteobacteria* obtenido por el método de *Neighbour-joining*. La secuencia perteneciente a la clase *Alfaproteobacteria* (*Rhodobacter sphaeroides*) funciona como *outgroup*. De los valores de *bootstrap* como porcentaje de 1000 replicados sólo se muestran aquellos que sean mayores o iguales al 50%. Los nombres de las especies se muestran junto al número de acceso de UniProt. La barra de escala indica el número medio de sustituciones por sitio. El grupo A corresponde a las secuencias de *Acinetobacter*, organizadas en los sub-grupos I y II y el grupo S corresponde a las secuencia de *S. maltophilia* K279a.

## CONCLUSIONES

- El análisis de la distribución de las proteínas BLUF, mostró que el 8,75% de todas las bacterias con genomas secuenciados poseen secuencias codificantes para proteínas BLUF putativas. De estas bacterias el 47,49% pertenece a la clase *Gammaproteobacteria* y el 80,09% son quimiotróficas.
- Dentro de las bacterias quimiotróficas la arquitectura de proteína BLUF corta es la más frecuente.
- Todas las especies del género *Acinetobacter* que poseen secuencias codificantes para proteínas BLUF presentan una arquitectura BLUF corta. Mientras que *A. baumannii* posee un único gen codificante para proteína BLUF, *A. calcoaceticus* PHEA-2, *A. radioresistens* WCA157, *A. baylyi* ADP1 y *A. oleivorans* DR1 poseen múltiples secuencias codificantes para proteínas BLUF putativas, lo que refleja la importancia de su conservación para la función fisiológica en la que participan.
- El alineamiento de las cuatro secuencias correspondientes a proteínas BLUF putativas de *A. baylyi* ADP1 mostró que todas presentan los aminoácidos necesarios para interactuar con su cromóforo FAD y desencadenar un fotociclo bajo la incidencia de la luz azul.
- El análisis del contexto genómico de los genes codificantes para proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 no ha permitido identificar otros componentes participantes en la vía de transducción de señales.
- El análisis filogenético mostró que las secuencias correspondientes a los dominios BLUF de miembros del género *Acinetobacter* forman un grupo dividido en dos ramas. Considerando que la distribución de las secuencias difiere a la esperada de acuerdo a la especiación y que los cálculos de las distancias dentro de las secuencias del grupo era similar a la esperada por tasa de mutación debida a la evolución, se propone que la ramificación podría haber surgido de un evento de duplicación del gen codificante en un ancestro en común previo a la especiación y posteriores mutaciones. Además la pérdida de uno o varios genes es una hipótesis que debe ser considerada para explicar la presencia de una única secuencia BLUF en *A. baumannii*.

# Capítulo 3

**Análisis de proteínas BLUF en *Acinetobacter*:**

***A. baylyi* ADP1 como organismo modelo**

## INTRODUCCIÓN

Los dominios BLUF se encuentran formando parte de proteínas de organismos pertenecientes a los dominios Bacteria y Eucariota, no habiéndose aún descrito en los genomas disponibles de Arqueas. El primer dominio BLUF fue descubierto en la región N-terminal de la proteína AppA de *Rhodobacter sphaeroides* y tomando este como modelo, Gomelsky y Klug realizaron un análisis bioinformático que les permitió dividir a las proteínas BLUF en dos categorías: las proteínas “complejas”, en el caso de proteínas con múltiples dominios, y las proteínas “cortas”, compuestas sólo por el dominio BLUF más 30-70 aminoácidos adicionales sin función aparente (Gomelsky y Klug, 2002). A pesar de que muchos organismos presentan genes codificantes para proteínas BLUF, sólo algunas proteínas han sido estudiadas en cuanto a su actividad como fotorreceptores y son pocos aún los ejemplos en los cuales se las ha asociado a una respuesta biológica debida al efecto de la luz (Tabla 9).

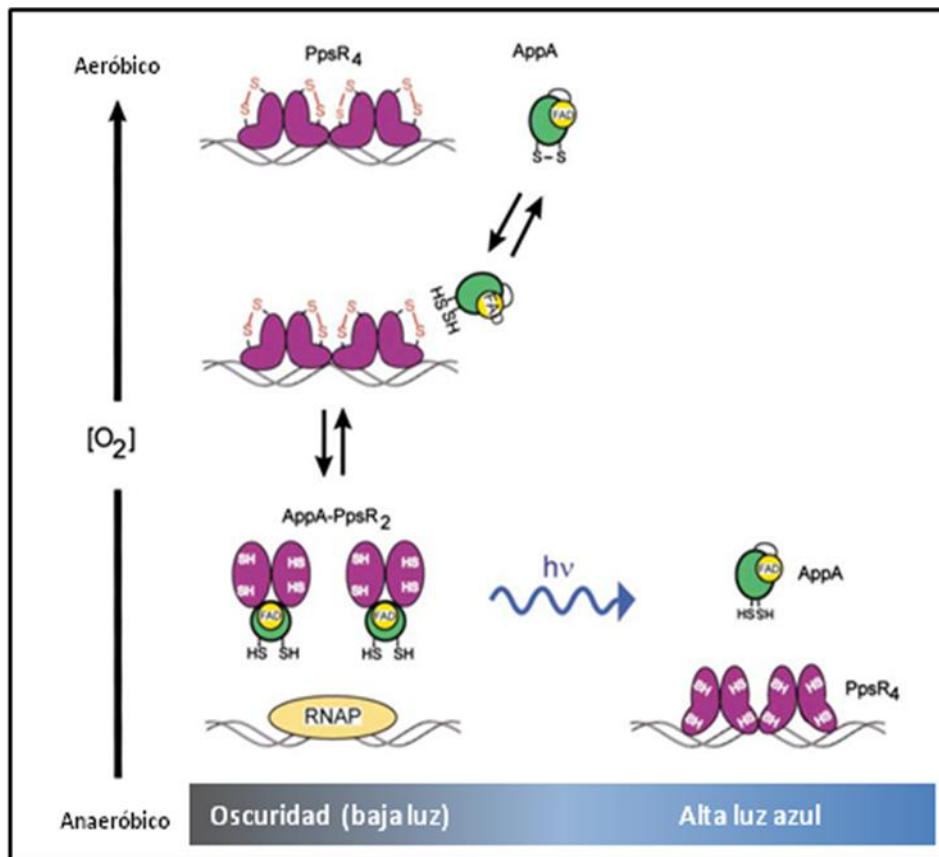
**Tabla 9. Proteínas BLUF activas**

| BLUF             | Proteína                   | Arquitectura    | Organismo                        | Respuesta             |
|------------------|----------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------------|
| <b>Complejas</b> | AppA                       | BLUF-SCHIC      | <i>R. sphaeroides</i>            | Expresión génica      |
|                  | YcgF                       | BLUF-EAL        | <i>E. coli</i>                   | Biofilm               |
|                  | BlrP                       | BLUF-EAL        | <i>K. pneumoniae</i>             | Hidrólisis c-di-GMP * |
|                  | PAC $\alpha$ , PAC $\beta$ | BLUF-AC-BLUF-AC | <i>E. gracilis</i>               | Fototaxis             |
|                  | nPAC                       | BLUF-AC         | <i>N. gruberi</i> NEG-M          | Síntesis de AMPc*     |
|                  | bPAC                       | BLUF-AC         | <i>Beggiatoa</i> sp.             | Síntesis de AMPc*     |
| <b>Cortas</b>    | BlrB                       | BLUF            | <i>R. sphaeroides</i>            | ?                     |
|                  | TePixD                     | BLUF            | <i>T. elongatus</i> BP-1         | ?                     |
|                  | PixD                       | BLUF            | <i>Synechosystis</i> sp. PCC6803 | Motilidad             |
|                  | PapB                       | BLUF            | <i>R. palustris</i>              | Biofilm               |
|                  | BlsA                       | BLUF            | <i>A. baumannii</i>              | Motilidad             |
|                  |                            |                 |                                  | Biofilm<br>Virulencia |

\* Si bien la función como fotorreceptor se ha confirmado, en la mayoría de los casos se desconoce la vía de transducción de la señal y/o, la/s respuesta/s biológica/s asociada/s. AC: adelinato ciclasa. AMPc: adenosina monofosfato cíclica. c-di-GMP: diguanilato monofosfato cíclico.



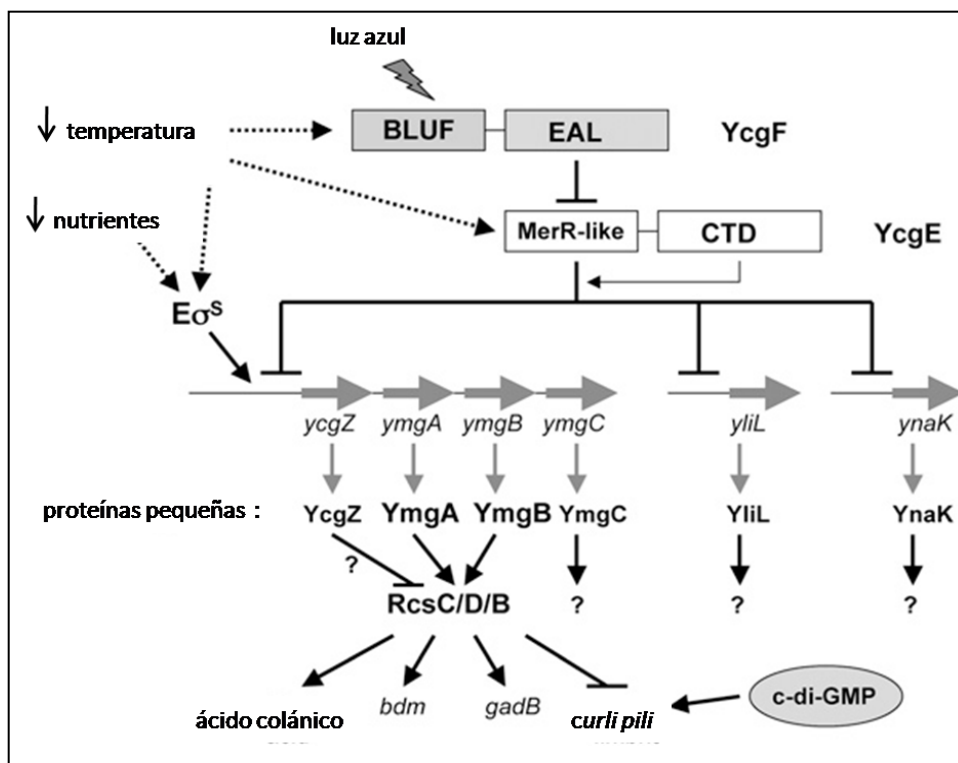
Los dos sistemas más estudiados en cuanto al mecanismo de transducción de la señal luminosa por proteínas BLUF son el de la proteína AppA de *Rhodobacter sphaeroides* y YcgF de *Escherichia coli*. La proteína AppA es un anti-represor transcripcional que controla la expresión de genes de fotosíntesis y responde tanto a la irradiación de luz azul como a la tensión de oxígeno (Gomelsky y Kaplan, 1998). La región N-terminal de AppA está constituida por un dominio BLUF sensor de luz azul (Gomelsky y Klug, 2002), la región central consiste en un dominio denominado *sensor containing heme instead of cobalamin* (SCHIC) necesario para percibir el nivel de oxígeno (Moskvin y col., 2007) y la región C-terminal consiste en un dominio rico en cisteína (Masuda y Bauer, 2002). AppA actúa como anti-represor de la expresión de genes de fotosíntesis en condiciones anaeróbicas y de baja luminosidad (Figura 23).



**Figura 23. Modelo del sistema de regulación de la expresión de genes de fotosíntesis en *R. sphaeroides*. Interacción de AppA y PpsR en respuesta al oxígeno y la luz azul (Masuda y Bauer, 2002).**

*E. coli* es capaz de percibir la luz azul mediante su fotorreceptor YcgF, regulando la formación de biofilm. YcgF está constituido por un dominio BLUF y un dominio EAL. Si bien la función del dominio EAL ha sido objeto de múltiples controversias, en la actualidad la vía de transducción ha sido elucidada y se demostró que el dominio EAL de YcgF se encuentra degenerado y no posee la

esperada actividad fofodiesteriasa de c-di-GMP, sino que actúa como regulador transcripcional. En condiciones de iluminación por luz azul YcgF se une directamente al represor MerR-like (YcgE) y lo libera de su unión al ADN, lo que permite la expresión del operón *ycgZ-ymgABC* y la activación del sistema Rcs, lo que promueve la producción de biofilm (Figura 24) (Tschowri y col., 2009). Estudios recientes identificaron el sitio de unión de YcgE en el promotor del gen *ycgZ*. La vía de señalización de YcgF/YcgE no se encuentra solamente influenciada por la luz, sino que también responde a condiciones de estrés general y baja temperatura. La baja temperatura (16°C) induce la expresión de *ycgF*, *ycgE* y del operón *ycgZ-ymgABC*, mientras que el factor de transcripción  $\sigma^S$  (activo en condiciones de estrés como ser la limitación de nutrientes) sólo estimula la expresión de dicho operón. El hecho de que el sistema YcgF/YcgE se encuentre regulado por la escasez de nutrientes, baja temperatura e intensa radiación de luz azul, permitió a los autores especular que este sistema es importante para el crecimiento y supervivencia de *E. coli* en el ambiente marino (Tschowri y col., 2009).



**Figura 24. Modelo del sistema YcgF/YcgE de *E. coli*.** Efecto de la luz azul, la baja temperatura y el estrés (por ejemplo, la baja disponibilidad de nutrientes) en la expresión de proteínas pequeñas y la consecuente formación de biofilm (Tschowri y col., 2009).

Si bien las modificaciones estructurales generadas debido a la absorción de luz por proteínas BLUF pueden modificar la actividad de factores de transcripción, existen sistemas en los que el control

de la expresión génica se realiza por medio de segundos mensajeros, como son los derivados cíclicos de nucleótidos, en particular c-di-GMP y AMPc. La molécula de c-di-GMP es un segundo mensajero global bacteriano que participa en una gran variedad de funciones celulares, entre las que se encuentran la formación de biofilm, virulencia, motilidad y resistencia a antibióticos. El nivel de c-di-GMP depende de la actividad de proteínas con dominios GGDEF y/o EAL, que corresponden a una diguanilato ciclasa que cataliza la síntesis de c-di-GMP y una fosfodiesterasa que cataliza la hidrólisis de c-di-GMP, respectivamente. Un ejemplo es la proteína BlrP1 de *Klebsiella pneumoniae* que posee una fosfodiesterasa con función catalítica en la región C-terminal (EAL) regulada por la luz azul a través de su dominio BLUF N-terminal (Barends y col., 2009). El segundo mensajero AMPc es ubicuo en bacterias y está relacionado con numerosos procesos biológicos. En particular, se han descrito proteínas fotorreceptoras con un dominio efector con actividad adenilato ciclasa (AC) el cual cataliza la síntesis de AMPc a partir de adenosina trifosfato. El primer fotorreceptor con una arquitectura BLUF-AC fue descrito en el flagelado unicelular *Euglena gracilis* (Iseki y col., 2002) y consiste en un heterotetrámero denominado *photoactivated adenyl cyclase* (PAC) formado por dos subunidades  $\alpha$  (PAC $\alpha$ ) y dos subunidades  $\beta$  (PAC $\beta$ ), cada subunidad a su vez es portadora de dos dominios BLUF y dos AC. Si bien este fotorreceptor es el responsable de la respuesta fotofóbica ante la incidencia de luz azul, el mecanismo mediante el cual esta respuesta se lleva a cabo es aún desconocido (Iseki y col., 2002; Ntefidou y col., 2003). Recientemente, dos fotorreceptores con arquitectura BLUF-AC fueron descritos en otro organismo eucarionte *Naegleria gruberi* NEG-M (Penzkofer y col., 2011) y en la bacteria *Beggiatoa* sp. (Stierl y col., 2010; Ryu y col., 2010).

Entre las proteínas BLUF cortas, es decir aquellas que poseen un único dominio BLUF sin otra actividad aparente asociada, se destacan BlrB de *R. sphaeroides* (Jung y col., 2005) y TePixD de *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (Okajima y col., 2005). Ambas fueron descritas en cuanto a su actividad como fotorreceptores, pero la respuesta biológica desencadenada por la luz, así como los posibles transductores de la señal son aún desconocidos. Por otro lado, la proteína fotorreceptora PixD presente en *Synechocystis* sp. PCC6803 está implicada en la regulación de la motilidad fototáctica hacia la luz azul (Okajima y col., 2005). Se ha demostrado que en oscuridad PixD forma un complejo de alto peso molecular con el regulador de respuesta PixE, (PixD<sub>10</sub>-PixE<sub>5</sub>) y que la iluminación de la flavina en PixD desestabiliza al complejo en monómeros de PixE y dímeros de PixD (Yuan y Bauer, 2008). Otro caso previamente mencionado es el descrito para PapB de

*Rhodopseudomonas palustris*, donde la luz inhibe la formación de biofilm gatillada por una interacción proteína-proteína (Kanazawa y col., 2010). Por último, estudios realizados en *A. baumannii* ATCC 17978, describieron a su proteína conteniendo BLUF (BlsA) y demostraron que la luz azul captada por dicha proteína produce inhibición de la formación de biofilm y de la motilidad y aumenta la virulencia de este patógeno oportunista. El efecto de la luz sobre la motilidad y la formación de biofilm fueron dependientes de la temperatura, siendo máximo a 24°C y nulo a 37°C. Si bien, el fotorreceptor fue caracterizado, aún no se ha dilucidado la vía de transducción de la señal lumínica (Mussi y col., 2010).

Mientras que el genoma de *A. baumannii* presenta una única secuencia codificante para proteína BLUF, *A. baylyi* ADP1 posee cuatro secuencias putativas para proteínas BLUF, un hecho que no es excepcional en la clase *Gammaproteobacteria* (ver Capítulo 2). La necesidad de la abundancia de estos genes es actualmente desconocida. En este capítulo se estudió *A. baylyi* ADP1 como organismo modelo, para lo cual se evaluaron distintos fenotipos a fin de establecer la existencia de una regulación mediada por luz. Además, se abordó la cuestión de la redundancia funcional de las cuatro proteínas BLUF mediante el noqueo individual o múltiple de los genes, construcción de cepas complementadas y su correspondiente análisis fenotípico en condiciones de luz azul u oscuridad. Si bien se intentaron diferentes estrategias para la expresión heteróloga de las cuatro proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1, no fue posible la obtención de proteínas con actividad biológica (ver Anexo 2).

## OBJETIVOS

Los objetivos específicos de este capítulo son:

- Estudio de la respuesta a la luz en *A. baylyi* ADP1 e identificación de posibles fenotipos asociados
- Evaluación del efecto de factores ambientales relacionados
- Obtención de mutantes noqueadas en genes codificantes para proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 y su evaluación geno/fenotípica
- Reconstrucción de fenotipos mediante complementación
- Análisis de la expresión de los genes codificantes para proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 bajo condiciones de luz y oscuridad
- Expresión heteróloga de las proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 (ver Anexo 2).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cepas y condiciones de cultivo.** Las cepas bacterianas y plásmidos utilizadas en este capítulo se describen en la Tabla 10. *A. baylyi* ADP1 y sus mutantes noqueadas en genes codificantes para proteínas BLUF (simple, doble y triple) fueron cultivadas en Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 30 ml de medio de cultivo o en tubos de ensayo conteniendo 5 ml de caldo Lisogénico (LB) a 30°C, con agitación (200 rpm). En el caso de las mutantes noqueadas conteniendo un gen de resistencia se agregó kanamicina (15 µg/ml) al medio de cultivo. Las cepas de *Escherichia coli* fueron cultivadas de la igual manera, utilizando 37°C como temperatura de crecimiento y agregando ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml), según el plásmido que posea la cepa utilizada (Tabla 10). Para el mantenimiento de las cepas, estas se crecieron en placas de LB conteniendo agar (15 g/l) y se agregó el antibiótico adecuado para el crecimiento de aquellas cepas que contenían gen de resistencia. Las cepas se almacenaron a -80°C en crioviales conteniendo glicerol 20% (v/v).

**Tabla 10. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en el capítulo 3**

| Cepa/plásmido                     | Características relevantes*                                     | Origen/referencia            |
|-----------------------------------|---|------------------------------|
| <i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1  | Salvaje   | UvA, Amsterdam, Holanda      |
| Mutantes de <i>A. baylyi</i> ADP1 |   |                              |
| AAC320-1                          | <i>lipA::lacZ</i> , Kan <sup>r</sup>                            | (Kok y col., 1996)           |
| 1499KO                            | ACIAD1499:: <i>nptII</i> , Kan <sup>r</sup>                     | Este trabajo                 |
| 2110KO                            | ACIAD2110:: <i>nptII</i> , Kan <sup>r</sup>                     | Este trabajo                 |
| 2125KO                            | ACIAD2125:: <i>nptII</i> , Kan <sup>r</sup>                     | Este trabajo                 |
| 2129KO                            | ACIAD2129:: <i>nptII</i> , Kan <sup>r</sup>                     | (de Berardinis y col., 2008) |
| B++M1                             | ΔACIAD1499  | Este trabajo                 |
| B++M2                             | ΔACIAD1499/ ΔACIAD2125  | Este trabajo                 |
| B++M3                             | ΔACIAD1499/ ΔACIAD2125/ΔACIAD2129                               | Este trabajo                 |
| Cepas complementadas              |   |                              |
| 1499KO-C1499                      | 1499KO conteniendo pWp1499, Kan <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> | Este trabajo                 |
| 1499KO-C2125                      | 1499KO conteniendo pWp2125, Kan <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> | Este trabajo                 |
| 1499KO-C2129                      | 1499KO conteniendo pWp2129, Kan <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> | Este trabajo                 |

**Tabla 10. Continuación**

| Cepa/plásmido           | Características relevantes*  | Origen/referencia      |
|-------------------------|--|------------------------|
| 2125KO-C1499            | 2125KO conteniendo pWp1499, Kan <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>  | Este trabajo           |
| 2125KO-C2125            | 2125KO conteniendo pWp2125, Kan <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>  | Este trabajo           |
| 2125KO-C2129            | 2125KO conteniendo pWp2129, Kan <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>  | Este trabajo           |
| 2129KO-C1499            | 2129KO conteniendo pWp1499, Kan <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>  | Este trabajo           |
| 2129KO-C2125            | 2129KO conteniendo pWp2125, Kan <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>  | Este trabajo           |
| 2129KO-C2129            | 2129KO conteniendo pWp2129, Kan <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup>  | Este trabajo           |
| B++M3-C1499             | B++M3 conteniendo pWp1499, Tet <sup>r</sup>  | Este trabajo           |
| B++M3-C2125             | B++M3 conteniendo pWp2125, Tet <sup>r</sup>  | Este trabajo           |
| B++M3-C2129             | B++M3 conteniendo pWp2129, Tet <sup>r</sup>  | Este trabajo           |
| <i>Escherichia coli</i> |  |                        |
| DH5α                    | Cepa para clonado  | Gibco-BRL              |
| Top 10                  | Cepa para clonado  | Invitrogen             |
| Plásmidos               |  |                        |
| pGEM3zf(+)              | Vector de clonado, Amp <sup>r</sup>  | Promega                |
| pAMB6                   | pGEM3zf(+) con secuencia interna de ACIAD1499 en <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I, Amp <sup>r</sup>   | Este trabajo           |
| pAMB7                   | pGEM3zf(+) con secuencia interna de ACIAD2110 en <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I, Amp <sup>r</sup>   | Este trabajo           |
| pAMB8                   | pGEM3zf(+) con secuencia interna de ACIAD2125 en <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I, Amp <sup>r</sup>   | Este trabajo           |
| pAMB6K                  | pGEM3zf(+) con secuencia interna de ACIAD1499 en <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I y gen de Kan en <i>Sma</i> I, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> | Este trabajo           |
| pAMB7K                  | pGEM3zf(+) con secuencia interna de ACIAD2110 en <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I y gen de Kan en <i>Sma</i> I, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> | Este trabajo           |
| pAMB8K                  | pGEM3zf(+) con secuencia interna de ACIAD2125 en <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I y gen de Kan en <i>Sma</i> I, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> | Este trabajo           |
| pK19 <i>mob sacB</i>    | Vector móvil, <i>oriT sacB</i> , Kan <sup>r</sup>  | (Schafer y col., 1994) |
| pK1499                  | pK19 <i>mobsacB</i> conteniendo regiones flanqueantes de ACIAD1499 obtenidas mediante PCR por solapamiento, Kan <sup>r</sup>                   | Este trabajo           |
| pK2125                  | pK19 <i>mobsacB</i> conteniendo regiones flanqueantes de ACIAD2125 obtenidas mediante PCR por solapamiento, Kan <sup>r</sup>                   | Este trabajo           |
| pK2129                  | pK19 <i>mobsacB</i> conteniendo regiones flanqueantes de ACIAD2129 obtenidas mediante PCR por solapamiento, Kan <sup>r</sup>                   | Este trabajo           |

**Tabla 10. Continuación**

| Cepa/plásmido | Características relevantes*   | Origen/referencia     |
|---------------|---|-----------------------|
| pWH1266       | Vector <i>shuttle E. coli-Acinetobacter</i> , plásmido de <i>A. Iwoffii</i> clonado en sitio <i>PvuII</i> de pBR322 site, Amp <sup>r</sup> , Tet <sup>r</sup> | (Hunger y col., 1990) |
| pGp1499       | Amplicón conteniendo ACIAD1499 y su promotor nativo clonado en pGEM-T Easy; Amp <sup>r</sup>  | Este trabajo          |
| pGp2125       | Amplicón conteniendo ACIAD2125 y su promotor nativo clonado en pGEM-T Easy; Amp <sup>r</sup>  | Este trabajo          |
| pGp2129       | Amplicón conteniendo ACIAD2129 y su promotor nativo clonado en pGEM-T Easy; Amp <sup>r</sup>  | Este trabajo          |
| pWp1499       | pWH1266 conteniendo ACIAD1499 y su promotor nativo clonado en sitios <i>PstI</i> y <i>EcoRI</i> , Amp <sup>s</sup> , Tet <sup>r</sup>                         | Este trabajo          |
| pWp2125       | pWH1266 conteniendo ACIAD2125 y su promotor nativo clonado en sitios <i>PstI</i> y <i>EcoRI</i> , Amp <sup>s</sup> , Tet <sup>r</sup>                         | Este trabajo          |
| pWp2129       | pWH1266 conteniendo ACIAD2129 y su promotor nativo clonado en sitios <i>PstI</i> y <i>EcoRI</i> , Amp <sup>s</sup> , Tet <sup>r</sup>                         | Este trabajo          |

\* Kan<sup>r</sup>, kanamicina resistente; Amp<sup>r</sup>, ampicilina resistente; Amp<sup>s</sup>, ampicilina sensible; Tet<sup>r</sup>, tetraciclina resistente.

**Curva de crecimiento.** A partir de un cultivo de *A. baylyi* ADP1 en LB crecido durante 16 h en oscuridad se realizó una dilución 1/100 en LB fresco y se alicuotó en fracciones de 50 ml en seis Erlenmeyers. Tres muestras fueron crecidas bajo luz blanca (con una intensidad de  $\sim 11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y las tres restantes fueron crecidas en oscuridad (Erlenmeyers cubiertos con papel aluminio), todas a 30°C con agitación (200 rpm). Durante once horas se tomaron muestras de los seis Erlenmeyers (con intervalos de una hora aproximadamente), determinándose la absorbancia a 540 nm de cada una de ellas (DO<sub>540</sub>). Con los datos de DO<sub>540</sub> y la curva de calibración DO<sub>540</sub> vs peso seco (PS), se obtuvieron los correspondientes PS. Los resultados de la curva de crecimiento se expresaron como PS (g/l) vs Tiempo (h).

Para realizar la curva de calibración DO vs. PS se tomó una muestra final de cada condición (luz u oscuridad) crecida durante 11 h en LB a 30°C con agitación (200 rpm). Con cada muestra se realizaron cuatro diluciones con solución fisiológica de manera de obtener una DO<sub>540</sub> de 0,2; 0,4; 0,8 y 1,2; y necesitando un volumen final de 160 ml para las DO<sub>540</sub> de 0,2 y 0,4, y 80 ml para el caso de DO<sub>540</sub> de 0,8; 1,2. Se midió la DO<sub>540</sub> de cada dilución y se obtuvieron sus correspondientes pellets mediante centrifugación a 14000 rpm durante 5 min. Los pellets se lavaron con solución



fisiológica, se colocaron en tubos previamente pesados y se secaron en estufa a 80°C hasta que el peso fue constante (~ 48 h). El peso de cada dilución (peso final – peso del tubo) se correlacionó con la OD<sub>540</sub> medida inicialmente y se obtuvieron dos curvas de calibración de DO vs. PS, una para cada condición (luz u oscuridad).

**Ensayo de biofilm.** La determinación de formación de biofilm se realizó mediante una adaptación del ensayo descrito previamente por Mussi (Mussi y col., 2010). Para tal fin, un cultivo de *A. baylyi* ADP1 crecido durante 16 h en LB en oscuridad fue diluído 1/100 en LB fresco. A partir de esta dilución se colocaron alícuotas de 2 ml en 20 tubos estándar de 15 ml de polipropileno y se incubaron por cuatro días sin agitación a 24°C o 30°C, igual cantidad de muestras bajo luz blanca (con una intensidad de ~ 11  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y en oscuridad (cubiertos con papel aluminio). Para cada condición (luz u oscuridad) la mitad de los tubos fueron utilizados para la determinación de la formación de biofilm mediante tinción con cristal violeta (CV) y los restantes para la medición de biomasa. En el primer caso, luego del período de incubación, los sobrenadantes fueron removidos cuidadosamente y los tubos se lavaron cinco veces con PBS, se secaron en posición invertida y se tiñeron con una solución de CV 1% (p/v) durante 20 min. Los tubos fueron nuevamente lavados cinco veces con PBS, las células teñidas se solubilizaron con 2 ml de etanol durante 30 min con agitación (80 rpm) y se midió DO<sub>587</sub>. Para determinar la biomasa total (células de la película, células adheridas y agregados celulares), los tubos fueron centrifugados a 14000 rpm durante 5 min y las células se resuspendieron en 2 ml de PBS, cada muestra se sonicó por 10 seg a baja potencia con un tip fino y se vortexeo por 1 min. Se midió la DO<sub>540</sub> de las células resuspendidas y la formación de biofilm se expresó como DO<sub>587</sub>/DO<sub>540</sub>. El ensayo se realizó dos veces por quintuplicado y los resultados se expresaron como media  $\pm$  DS.

**Expresión de *lipA*.** Para evaluar los niveles de expresión de *lipA* en luz y oscuridad se utilizó la cepa AAC320-1, la cual contiene una fusión *lipA::lacZ* (Kok y col., 1996), por lo cual es posible medir la actividad de su promotor mediante la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cultivos de la mutante. Se realizó un cultivo de AAC320-1 en LB conteniendo kanamicina (25  $\mu\text{g/ml}$ ), a 30°C con agitación (200 rpm) durante 16 h en oscuridad. Se determinó el crecimiento por medición de DO<sub>540</sub> y se realizó una dilución con el mismo medio a fin de obtener una DO<sub>540</sub> ~ 0,1. Esta dilución se distribuyó en seis Erlenmeyers, tres de los cuales fueron crecidos en oscuridad

(cubiertos con papel aluminio) y los tres restantes bajo luz blanca (con una intensidad de  $\sim 11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Se tomaron muestras cada 1,5 o 2 h, se midió la absorbancia ( $\text{DO}_{540}$ ) y se cosecharon las células por centrifugación. Las muestras se resuspendieron en el volumen original con buffer Z (300 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 200 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 50 mM KCl, 5 mM  $\text{MgSO}_4$  y 0,004% SDS) y para la determinación de  $\beta$ -galactosidasa se utilizaron 200  $\mu\text{l}$ , en el caso de las muestras tomadas a las 1,5 y 3 h, y 100  $\mu\text{l}$  en el caso de las muestras tomadas a las 4,5; 6 y 8 h. Como blanco de la reacción se utilizó el mismo buffer Z como muestra. La determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizó utilizando o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranososa (ONPG) como sustrato según como se describió previamente (Miller, 1982). A cada muestra se le agregó buffer Z conteniendo 250 mM  $\beta$ -mercaptoetanol en c.s.p 1,25 ml y las muestras se lisaron mediante el agregado de 50  $\mu\text{l}$  de cloroformo, 100  $\mu\text{l}$  de SDS 0,1% (p/v), se vortexeó por 15 seg y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 min. Luego se realizó la reacción de color, para la cual se agregaron 250  $\mu\text{l}$  de la solución de ONPG (2 mg/ml en buffer Z) y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 20 min. La reacción se detiene por el agregado de 0,5 ml de solución 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , se mezcla y luego de 10 min se mide la absorbancia a 420 nm y 540 nm. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se expresó en unidades Miller (U.M.), calculadas de la siguiente manera:

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa (U.M.)} = 1000 \times \frac{(\text{DO}_{420}^{(4)} - 1,55 \times \text{DO}_{540}^{(5)})}{t^{(3)} \times \text{vol}^{(2)} \times \text{DO}_{540}^{(1)}}$$

Donde:

- (1)  $\text{DO}_{540}$  medida luego de tomar las muestras (densidad celular).
- (2) volumen (ml) de muestra utilizada en el ensayo (0,2 ml para las muestra de 1,5 h y 3 h y 0,1 ml para las muestras tomadas a las 4,5, 6 y 8 h).
- (3) tiempo de reacción (min), 20 min.
- (4)  $\text{DO}_{420}$  correspondiente a la absorbancia del producto de la reacción.
- (5)  $\text{DO}_{540}$  corresponde al aporte en absorbancia de los desechos celulares, que al multiplicar por 1,55 aproxima a la dispersión observada a 420 nm. Si bien para *E. coli* se utiliza un factor de 1,75 (calculado por Miller), para *Acinetobacter* se utiliza 1,55.

**Determinación de sideróforos de tipo catecol.** A partir de un cultivo de *A. baylyi* ADP1 crecido en LB conteniendo glucosa 0,5% (p/v) durante  $\sim 8$  h en oscuridad, se realizó una dilución 1/100 y con esta se inocularon doce Erlenmeyers conteniendo el mismo medio. A seis Erlenmeyers se les agregó además una solución de ácido etilen-diamino-di hidroxifenil-acético (EDDHA) a fin de

obtener una concentración final de 400  $\mu\text{M}$  de este complejante de hierro. Tres inóculos con cada medio de cultivo (LB-Glu y LB-Glu-EDDHA) fueron incubados bajo luz blanca (con una intensidad de  $\sim 11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y los tres restantes en oscuridad, a 30°C, con agitación (250 rpm), durante 16 h. Para cada condición se realizó un blanco que consistió en el correspondiente medio de cultivo sin inocular. Se midió la  $\text{DO}_{540}$  de todos cultivos, luego se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min a 4°C y se obtuvieron los sobrenadantes para la determinación de catecoles por el método de Arnow (Arnow, 1973) como se describió previamente (Nudel y col., 2001). La concentración de catecoles se normalizó a la biomasa medida por  $\text{DO}_{540}$  y los resultados se expresaron como  $\mu\text{M}/\text{DO}_{540}$ . El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como media  $\pm$  DS.

**Ensayo de motilidad tipo *Twitching* (*Twitching motility*).** El movimiento celular fue comprobado inicialmente en placas de LB blando, conteniendo bactotriptona (5 g/l), extracto de levadura (2,5 g/l), NaCl (5 g/l) y agar 1% (p/v). Para ello, a partir de una placa de *A. baylyi* ADP1 crecida durante 16 h en LB a 30°C se tomaron muestras con un palillo estéril y con estas se inocularon placas de LB blando preparadas en el momento. Cuatro placas fueron colocadas bajo luz blanca (con una intensidad de  $\sim 11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y cuatro en oscuridad (cubiertas con papel aluminio), a 30°C. A las 2, 4, 6 y 8 h se sacó una placa de cada condición y se observaron los halos de movimiento. Posteriormente, los ensayos de movimiento fueron realizados según la técnica descrita por Mussi y col., 2010. Las placas se prepararon en el momento y estas contenían bactotriptona (10 g/l), NaCl (5 g/l) y agarosa a una concentración que se ajustó de acuerdo a la temperatura utilizada en el ensayo. Una concentración de agarosa de 0.3 % (p/v) fue utilizada para aquellos ensayos incubados a 20°C o 24°C durante 48 h o 15 h, respectivamente. Para los ensayos realizados a 30°C o 35°C las placas se prepararon con 0.4 % (p/v) de agarosa y se incubaron durante 15 h o 9 h, respectivamente. Cuando se hayan empleado diferentes condiciones de incubación se indicarán en el texto. Las placas fueron inoculadas en la superficie con muestra tomada con un palillo estéril de una placa de LB crecida durante 16 h o con 3  $\mu\text{l}$  de un cultivo líquido en fase exponencial ( $\text{DO}_{600}$ : 0,3) e incubadas en oscuridad o bajo luz roja u azul. Se utilizaron luces rojas o azules de tipo LED con picos de emisión centrados a 634 nm y 456 nm, respectivamente y con una intensidad de 5 a 7  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  determinada con un espectroradiómetro LI-COR LI-1800. Luego de los períodos de incubación indicados, se midieron los diámetros de migración por *twitching* en muestras

triplicadas y se calculó la media  $\pm$  DS. Con el fin de comparar aquellos ensayos realizados a diferentes temperaturas los resultados de cada muestra se expresaron como una relación del diámetro medido en oscuridad y luz (O/L). Cuando se realizó la evaluación del movimiento en presencia y ausencia de hierro, se agregó al medio descripto 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  o 100  $\mu\text{M}$  EDDHA, respectivamente.

**Microscopía de contraste de fase.** Esta metodología se utilizó para evaluar el patrón del movimiento de *A. baylyi* ADP1. Para la preparación de las muestras se colocó 1 ml de LB blando conteniendo bacto triptona (5 g/l), extracto de levadura (2,5 g/l), NaCl (5 g/l) y agar 1% (p/v) en un portaobjeto y este se inoculó con *A. baylyi* ADP1 utilizando un palillo estéril. Cada portaobjeto se colocó dentro de una placa de Petri vacía y se incubó a 30°C durante 8 h bajo luz blanca (con una intensidad de  $\sim 11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) u oscuridad (placas cubiertas con papel aluminio). Luego de este período, los bordes de los halos de movimiento fueron observados en un microscopio Carl Zeiss Axioskop con contraste de fase a 400X.

**Determinación de ramnosa.** Para este ensayo se adaptó el protocolo descripto por Kaplan y Rosenberg (Kaplan y Rosenberg, 1982). Las muestras fueron extraídas luego del ensayo de movilidad por *twitching*. Se emplearon 12 placas de LB blando [bacto triptona (5 g/l), extracto de levadura (2,5 g/l), NaCl (5 g/l) y agar 1% (p/v)], las que fueron inoculadas con 10  $\mu\text{l}$  de un cultivo de *A. baylyi* ADP1 en crecimiento exponencial ( $\text{DO}_{600}$ : 0,3) e incubadas bajo luz blanca (con una intensidad de  $\sim 11 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) o en oscuridad (cubiertas con papel aluminio) a 30°C. Luego de seis horas de incubación las placas se lavaron con 2,5 ml de buffer fosfato (62 mM, pH 7) y las suspensiones se centrifugaron a 12000 x g durante 20 min a 4°C, separándose los sobrenadantes. A estos se les agregó 4 volúmenes de acetona fría, se incubaron en hielo durante 30 min, luego se centrifugaron a 12000 x g durante 10 min a 4°C y el precipitado blanco formado fue resuspendido hasta su volumen inicial con buffer fosfato. La medición de la cantidad de ramnosa de las muestras provenientes de ambas condiciones (luz u oscuridad) se realizó con el procedimiento de ácido sulfúrico-cisteína (Dische y Shettles, 1948), empleando una curva estándar de L-ramnosa (hasta 50  $\mu\text{g/ml}$ ) para la calibración  $\text{DO}_{396-430}$  vs ramnosa ( $\mu\text{g/ml}$ ). Por interpolación en dicha curva se obtuvieron las concentraciones de ramnosa presentes en las muestras analizadas a partir de las

medidas de DO de las mismas. Los resultados cada condición (luz u oscuridad) se expresaron como media  $\pm$  DS.

**Preparación de *Escherichia coli* ultracompetentes.** Las cepas de *E. coli* (XL1 blue – Strategene, DH5 $\alpha$  - Gibco-BRL, o Top10 - Invitrogen) se cultivaron en Erlenmeyers de 250 ml en caldo LB a 37°C, con agitación (250 rpm) durante 6 h. Este pre-cultivo fue diluido en LB (dilución 1/50) y cultivado a 18°C con agitación (200 rpm) durante toda la noche. Se monitoreó el cultivo midiendo la DO a 600 nm hasta que esta alcanzó una DO<sub>600</sub> ~0,55. Se colocó el Erlenmeyer con el cultivo en un baño con hielo durante 10 min, luego se cosecharon las células por centrifugación a 4 °C a 2500 x g durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se lavaron las células con 16 ml de una solución de 250 mM CaCl<sub>2</sub> frío. Las células se resuspendieron en 4 ml de buffer de transformación (55 mM MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 15 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 250 mM KCl y 10 mM PIPES pH 6,7), se agregaron 300  $\mu$ l de DMSO y se incubaron en hielo durante 10 min. Finalmente, las células preparadas se alicuotaron de a 100  $\mu$ l en tubos eppendorfs estériles y se congelaron a - 80°C.

**Transformación de *Escherichia coli* ultracompetentes.** La transformación química de *E. coli* ultracompetentes se realizó basándose en el protocolo sugerido por Invitrogen explicado en el manual “Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit” en la sección *One Shot®ChemicalTransformation*.

**Transformación de *A. baylyi* ADP1 y sus mutantes.** La transformación de *A. baylyi* ADP1 y sus derivadas mutantes noqueadas se realizó según la técnica descrita por Palmen (Palmen y col., 1993). Cuando se evaluó la frecuencia de transformación en luz y oscuridad, se partió de un cultivo de *A. baylyi* ADP1 crecido durante ~ 8 h en oscuridad. Se realizó una dilución 1/100 de dicho cultivo, se prepararon dos Erlenmeyers, cada uno conteniendo 30 ml de la dilución y fueron cultivados durante 16 h bajo la incidencia de la luz o en oscuridad (cubierto por papel aluminio). A partir de cada cultivo se realizó una dilución 1:25 en LB fresco, se colocaron 26 ml de cada dilución y se cultivaron en la misma condición de la que provenían (tres Erlenmeyers en luz y tres en oscuridad). Con cada muestra se analizó la transformabilidad por incorporación del plásmido pWH1266 (Tabla 10), según la técnica descrita por Palmen (Palmen y col., 1993) respetando la condición luz u oscuridad hasta el final del ensayo. Para determinar la frecuencia de transformación, se sembraron 50  $\mu$ l de la muestra luego de la transformación en placa de selección

precalentada a 30°C (número de transformantes) y 50 µl de una dilución de la misma muestra en placa de LB (número de células viables totales). Las placas se incubaron durante 2 días a 30°C y la frecuencia de transformación se calculó como el número de células transformadas/número de células viables totales. Los resultados se expresaron como la media ± DS de los triplicados.

**Procedimientos generales de ADN.** Los aislamientos de ADN se realizaron a partir de cultivos líquidos. El ADN genómico de *A. baylyi* ADP1 fue aislado con *Fast DNA Kit* (BIO101 System). Los ADN plasmídicos fueron aislados utilizando el kit adecuado, Miniprep o Midiprep, de acuerdo a la cantidad de ADN requerida y se siguieron las indicaciones del fabricante (Promega). Las digestiones de ADN fueron llevadas a cabo con enzimas de restricción siguiendo las indicaciones del proveedor (Promega). La amplificación de fragmentos de ADN se realizó mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando *taq* polimerasa y ADN genómico o ADNc como templado. Para aquellas reacciones que no requirieron una alta fidelidad en la amplificación se utilizó la enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase* Brasil (Invitrogen), mientras que en las que se requería alta fidelidad se utilizó *Platinum® Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen) o *Phusion®* (Finnzymes). La temperatura de hibridación fue entre 50°C y 58°C dependiendo de los oligonucleótidos utilizados. Los oligonucleótidos se diseñaron manualmente y fueron analizados con los programas disponibles en internet *Primer3*, *Oligoanalyzer* y con el programa informático *In silico* PCR. El análisis de los tamaños de los ADN extraídos, productos de PCR o de digestión enzimática fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 0,1 mM EDTA, ácido acético glacial c.s.p., pH 8) a un voltaje constante de 70 volts. Los fragmentos de ADN se visualizaron por exposición a la luz UV. Aquellos fragmentos de menos de 200 pb fueron analizados en geles de agarosa 2,5 %.(p/v). La purificación y ligación de fragmentos de ADN se realizó mediante el kit *Wizard® DNA Clean-Up System* y *ADN-ligasa T4*, respectivamente, en ambos casos se siguieron las indicaciones del proveedor (Promega). La secuenciación de fragmentos de ADN fue realizada en el Instituto de Biotecnología; INTA, Castelar, mediante métodos de secuenciamiento automático.

**Colony PCR.** Esta técnica se utilizó para evaluar los clones positivos de cepas de *E. coli* transformadas. Colonias puntuales provenientes de placas de transformación fueron reaisladas en una nueva placa de LB conteniendo el antibiótico empleado para la selección. A partir de dicha

placa se tomó una colonia con un palillo estéril y se resuspendió en 40  $\mu$ l de agua estéril. Esta suspensión se incubó 5 min a 95°C y se transfirió a hielo inmediatamente. Para la reacción de PCR se emplearon 2  $\mu$ l de la suspensión como templado.

**Construcción de mutantes en genes individuales de *A. baylyi* ADP1.** Para la construcción de mutantes noqueadas en genes codificantes para proteínas BLUF se realizó el procedimiento esquematizado en la Figura 25A. A partir de ADN genómico de *A. baylyi* ADP1 se amplificaron segmentos internos de los genes ACIAD1499, ACIAD2110 y ACIAD2125 mediante PCR con el uso de los oligonucleótidos 1499KOPF/1499KOPR, 2110KOPF/2110KOPR y 2125KOPF/2125KOPR, respectivamente (Tabla 11). Los productos de amplificación y el vector pGem-3zf(+) (Promega) fueron digeridos con *Pst*I y *Bam*HI, los fragmentos se purificaron y se realizó la ligación de los mismos al plásmido. Las células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  fueron transformadas con los productos de las ligaciones y las respectivas transformantes se seleccionaron en placas de LB conteniendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml), obteniéndose de esta manera los plásmidos pAMB6, pAMB7 y pAMB8. Debido a que *A. baylyi* ADP1 posee resistencia intrínseca a ampicilina (Gomez y Neyfakh, 2006), se introdujo un gen de kanamicina en el sitio *Sma*I de los plásmidos mencionados, para lo cual los vectores pAMB6, pAMB7 y pAMB8 fueron digeridos con dicha enzima y ligados a un gen de resistencia a kanamicina también digerido con *Sma*I. Las células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  fueron transformadas con los productos de las ligaciones y las transformantes se seleccionaron en placas de LB conteniendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y kanamicina (50  $\mu$ g/ml), obteniéndose de esta manera los plásmidos pAMB6K, pAMB7K y pAMB8K. Finalmente, se efectuó la transformación natural de *A. baylyi* ADP1 con 2  $\mu$ g de cada uno de los plásmidos, empleando la técnica antes descrita (Palmen y col., 1993) y la selección de las transformantes se realizó en placas de LB conteniendo kanamicina (15  $\mu$ g/ml). Las cepas que incorporaron el plásmido mediante un único evento de recombinación debieron ser confirmadas. Para ello se realizó la extracción del ADN genómico de las transformantes seleccionadas y se realizaron amplificaciones por PCR con un oligonucleótido diseñado para hibridar con el promotor SP6 del plásmido pGem-3zf(+) (SP6PF) y los oligonucleótidos 1499PR, 2110PR o 2125PR, los cuales hibridan con el extremo 5' de cada gen. Debido a que dicha región sólo está presente en el genoma de las respectivas mutantes, pero no se encuentra ni en el vector ni en la cepa salvaje, esto permitió confirmar que las mutantes simples tenían el plásmido insertado debido a un único evento de recombinación (Figura 25B). Las mutantes noqueadas en ACIAD1499, ACIAD2110 y ACIAD2125 se denominaron 1499KO, 2110KO

y 2125KO, respectivamente. La mutante simple en ACIAD2129 fue gentilmente provista por Genoscope (de Berardinis y col., 2008) y se la denominó 2129KO.

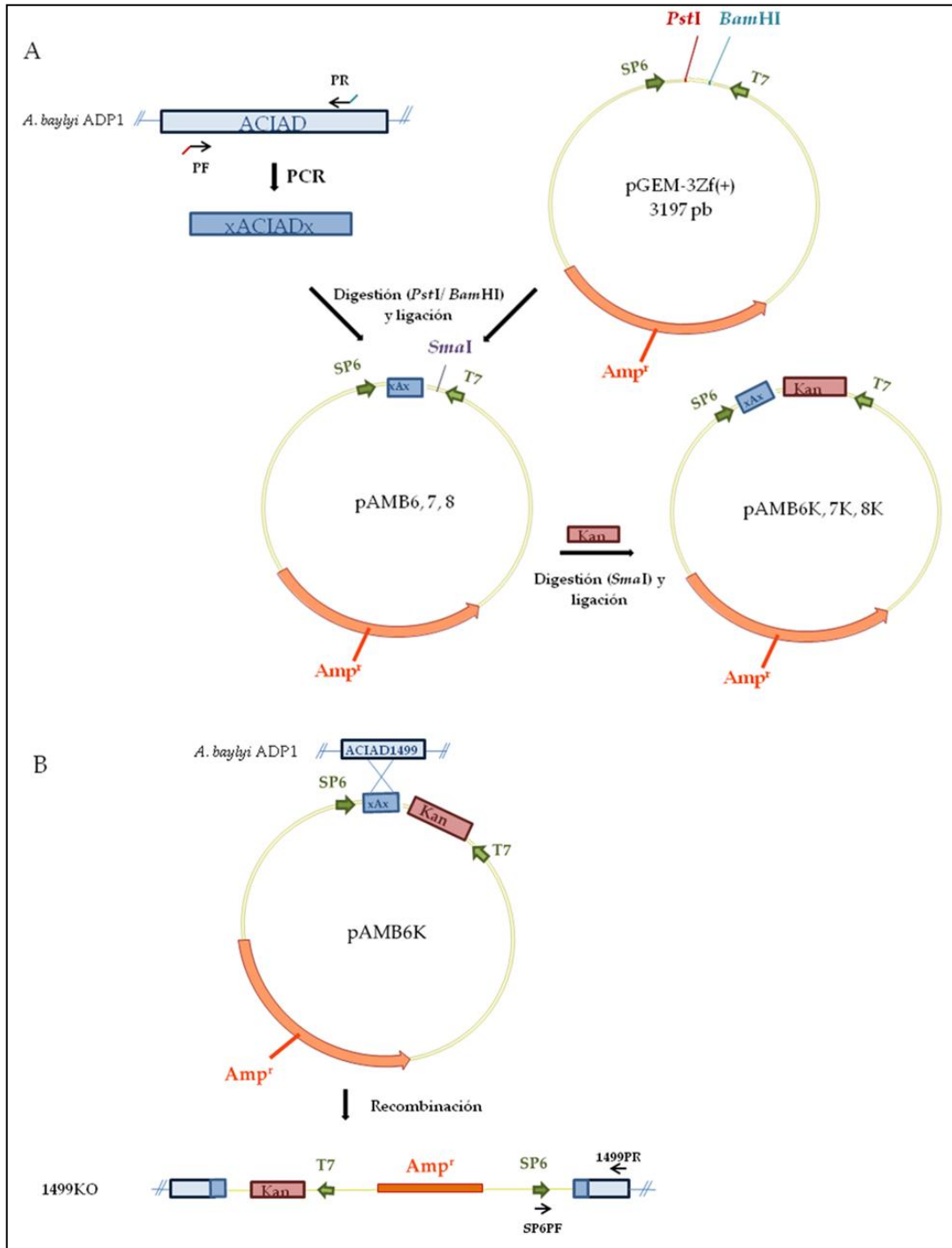


Figura 25. Esquema utilizado para la construcción de plásmidos y la generación de mutantes noqueadas en genes individuales codificantes para proteínas BLUF en *A. baylyi* ADP1 y confirmación de las mismas. **A.** Construcción de plásmidos pAMB6K, pAMB7K y pAMB8K para el noqueo de *A. baylyi* ADP1 en ACIAD1499, ACIAD2110 y ACIAD2125, respectivamente. **B.** Esquema utilizado para la confirmación de la mutante 1499KO.



**Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados en el capítulo 3**

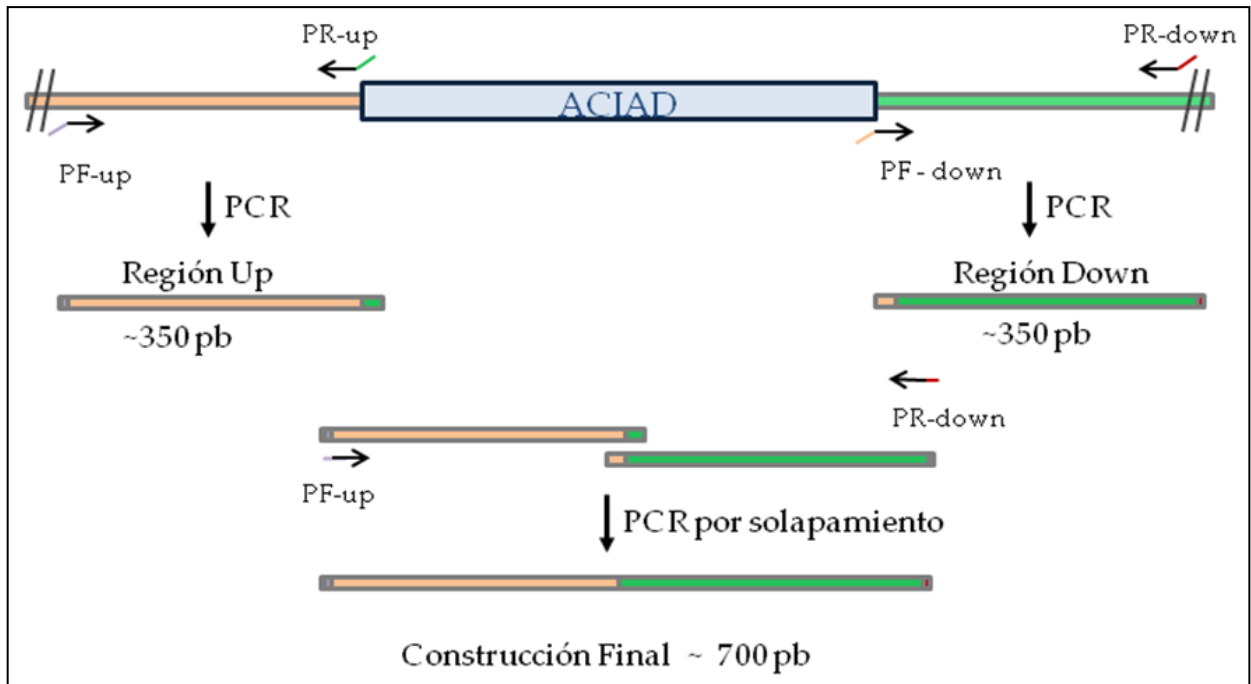
| Oligonucleótidos | Secuencia nucleotídica                                      |
|------------------|---|
| 1499KOPF         | 5'-GCATCTGCAGATACGTTTTAACTCAAT-3'                           |
| 1499KOPR         | 5'-GCATGGATCCATAAGGATTAATTCGT-3'                            |
| 2110KOPF         | 5'-GCATCTGCAGGAATTTAACTCAAATAATC-3'                         |
| 2110KOPR         | 5'-GCATGGATCCAGGCAAAGTTGTTTTATC-3'                          |
| 2125KOPF         | 5'-GCATCTGCAGAATGACATTACAGGGGT-3'                           |
| 2125KOPR         | 5'-GCATGGATCCAGAGTCTGTAGTAAGCA-3'                           |
| SP6PF            | 5'-GCATGGATCCATTTAGGTGACACTATAGAATACT-3'                    |
| 1499PR           | 5'-GCATCTGCAGTCAGGATGAATGAGGGTAAGGGTCA-3'                   |
| 2110PR           | 5'-GCATCTGCAGCTATAAGAATGGATTAATTCCTCTG-3'                   |
| 2125PR           | 5'-GCATCTGCAGCTAATGCATATCAGCTTGCTGAT-3'                     |
| 1499PF_up        | 5'-GAGAATTCCTTGAAGCACTTTATCAAC-3'                           |
| 1499PR_up        | 5'-GTTATCAGGATGAATGAGGGATCTAACATAGGCCATAGAAGTTC-3'          |
| 1499PF_down      | 5'-GAACTTCTATGGCCTATGTTAGATCCCTCATTTCCTGATAAC-3'            |
| 1499PR_down      | 5'-GCACTGCAGGTTTTTCATTA AAACTGGCC-3'                        |
| 2125PF_up        | 5'-GAGAATTC CATAACCATTGGTGGGTG-3'                           |
| 2125PR_up        | 5'-CAATTCTAATGCATATCAGCTTCTTACTTGCATACATCAAGC-3'            |
| 2125PF_down      | 5'-GCTTGATGTATGCAAGTAAGAAGCTGATATGCATTAGAATTG-3'            |
| 2125PR_down      | 5'-GCACTGCAGATTCAGGCAATATCATTGAC-3'                         |
| 2129PF_up        | 5'-GAGAATTCTATGTA C TACTCAAAATAGAG-3'                       |
| 2129PR_up        | 5'-GTA CTTAAGTTTTAAACATTATTTGGTAATTA AAAACAATACAAATACTTG-3' |
| 2129PF_down      | 5'-CAAGTATTTGTATTGTTTTAATTACCAAATAATGTTTTAACTTAAGTAC-3'     |
| 2129PR_down      | 5'-GCACTGCAGAGAATCATAACCAACCAGAGTC-3'                       |
| PF1499DEL        | 5'-ATTCTGCTGCATAAAGTCCAGC-3'                                |
| PR1499DEL        | 5'-ATTCCATTCTTCTCGATCAGC-3'                                 |
| PF2125DEL        | 5'-GCTTATCATTATGATTTGCCAGTTG-3'                             |
| PR2125DEL        | 5'-ACCCACATCTTTGTTCTATCGATAC-3'                             |
| PF2129DEL        | 5'-ACTTGGCAATTCGGTTATGC-3'                                  |
| PR2129DEL        | 5'-CATGAGTATCGTCAATACCAAACG-3'                              |
| P1499-PF         | 5'-GACCTGCAGCACTAATTACGCTCAAACAGTCG-3'                      |
| P1499-PR         | 5'-GCGAATTCTCAGGATGAATGAGGGTAAGG-3'                         |
| P2125-PF         | 5'-GACCTGCAGTTTCATGGTCTGCATTAAACAG-3'                       |
| P2125-PR         | 5'-CTAAGCTTCATCAATTCTAATGCATATCAGCTTG-3'                    |
| P2129-PF         | 5'-GACCTGCAGCGCAATAAAAATCATTCCAGATTAA-3'                    |
| P2129-PR         | 5'-CTAAGCTTTCCACTTTCAAATTAATATAAAGGAT-3'                    |
| RT1499PF         | 5'-TGTCAGCAAAACCGCCAAACA-3'                                 |
| RT1499PR         | 5'-CGTATTGCTGTTGTCAAGATTCCA-3'                              |
| RT2110PF         | 5'-AACGGGACCTTCTGGAAGAC-3'                                  |
| RT2110PR         | 5'-CGTCTGCATAATACAGGACACC-3'                                |

**Tabla 11. Continuación**

| Oligonucleótidos | Secuencia nucleotídica        |
|------------------|-------------------------------|
| RT2125PF         | 5'-CGAAACCATCGGAAAATCGATCC-3' |
| RT2125PR         | 5'-TGGTGCAAACCTTCATGCTCCAA-3' |
| RT2129PF         | 5'-ATGCAAGAATGCTGTATGTGAG-3'  |
| RT2129PR         | 5'-GTGCACCACAAATAGAATTTG-3'   |
| RecA_PF          | 5'-CGAATTGCATGGTAATCTTCATT-3' |
| RecA_PR          | 5'-CTTGACCAATACGGCGTATATCT-3' |

**Construcción de mutantes noqueadas en múltiples genes de *A. baylyi* ADP1.** El procedimiento descrito por Jones fue adaptado para la obtención de mutantes múltiples en genes codificantes para proteínas BLUF en *A. baylyi* (Jones y Williams, 2003). A partir de ADN genómico se amplificaron por PCR las regiones flanqueantes río arriba (Up) y río abajo (Down) de los genes ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129 usando los oligonucleótidos 1499PF\_up/1499PR\_up; 1499PF\_down/1499PR\_down; 2125PF\_up/2125PR\_up, 2125PF\_down/2125PR\_down; 2129PF\_up/2129PR\_up, 2129PF\_down/2129PR\_down, respectivamente (Tabla 11). Los oligonucleótidos fueron diseñados de manera tal que el extremo 5' del PR\_up hibride con el extremo 5' de la región Down y el extremo 5' del PF\_down hibride con el extremo 3' de la región Up (Figura 26). Las regiones flanqueantes de cada gen fueron purificadas y unidas mediante PCR por solapamiento utilizando los oligonucleótidos PF\_up y PR\_down correspondientes, obteniéndose la construcción final de ~ 700 pb. Las secuencias se clonaron en los sitios *EcoRI* y *PstI* del pK19 *mob sacB* (Schafer y col., 1994) y se transformaron en *E.coli* DH5 $\alpha$  para generar los plásmidos pK1499, pK2125 and pK2129, respectivamente (Tabla 10). *A. baylyi* ADP1 se transformó naturalmente con 2  $\mu$ g de pK1499 como se describió anteriormente (Palmen y col., 1993) y se seleccionaron las transformantes en placas de LB conteniendo kanamicina (15  $\mu$ g/ml). Las colonias seleccionadas por tener el plásmido insertado en una de las regiones flanqueantes, resultaron resistentes a kanamicina, pero eran incapaces de crecer en placas de LB conteniendo sacarosa 10 % (p/v) luego de incubarse durante 48 h a 16°C. Con el fin de facilitar el segundo evento de recombinación y con ello la delección del gen correspondiente, una colonia seleccionada se cultivó durante 24 h en LB sin antibiótico a 30°C con agitación (200 rpm). Una dilución del cultivo se sembró en placas de LB conteniendo sacarosa 10% (p/v) y se incubaron durante 48 h a 16°C. Se seleccionaron las colonias resistentes a sacarosa y su sensibilidad a kanamicina fue corroborada por ausencia de crecimiento en placas conteniendo kanamicina (15  $\mu$ g/ml). La delección del gen ACIAD1499 se confirmó mediante PCR y posterior secuenciación automática de ADN utilizando los oligonucleótidos PF1499DEL/PR1499DEL, los cuales hibridan por

fuera de las regiones flanqueantes (Tabla 11). La mutante noqueada en ACIAD1499 (denominada B++M1 en la Tabla 10) fue transformada luego con el plásmido pK2125, empleándose el procedimiento de selección descrito anteriormente con el fin de obtener la doble mutante noqueada en los genes ACIAD1499 y ACIAD2110 (denominada B++M2 en la Tabla 10). La delección en ACIAD2125 se confirmó mediante PCR y posterior secuenciación automática de ADN utilizando los oligonucleótidos PF2125DEL/PR2125DEL (Tabla 11) Para construir la mutante noqueada triple (denominada B++M3 en la Tabla 10), se transformó la mutante noqueada doble obtenida (B++M2) con pK2129, realizándose el proceso de selección de mutantes como se ha descrito anteriormente. La delección en ACIAD2129 se confirmó mediante PCR y posterior secuenciación automática de ADN utilizando los oligonucleótidos PF2129DEL/PR2129DEL (Tabla 11). De esta manera se obtuvo una triple mutante delecionada en los genes ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129.



**Figura 26. Esquema de las construcciones generadas para la obtención de mutantes delecciones en uno, dos y tres genes codificantes para proteínas BLUF en *A. baylyi* ADP1.** A partir de ADN genómico se amplifican por PCR las regiones flanqueantes río arriba (Up) y río abajo (Down) de los genes de interés usando los oligonucleótidos PF\_up/PR\_up, PF\_down/PR\_down, respectivamente. Los oligonucleótidos se diseñaron de manera tal que el extremo 5' del PR\_up hibride con extremo 5' de la región Down y el extremo 5' del PF\_down hibride con el extremo 3' de la región Up. Las regiones flanqueantes, cada una de ~ 350 pb, se unieron mediante PCR por solapamiento utilizando los oligonucleótidos PF\_up y PR\_down y se generó la construcción final de ~ 700 pb.

**Construcción de cepas complementadas.** Se obtuvieron fragmentos conteniendo a los genes ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129 con sus respectivos promotores nativos mediante

amplificación por PCR utilizando ADN genómico de *A. baylyi* ADP1 y los oligonucleótidos P1499-PF/P1499-PR, P2125-PF/P2125-PR y P2129-PF/P2129-PR, respectivamente (Tabla 11). A los productos de ADN purificados fue necesario agregarles un residuo de adenina para su clonado en pGEM-T Easy (Promega), para ello se realizó una reacción de PCR donde en lugar de agregar la solución de dNTPs se agregó una solución de dATP en igual concentración junto al resto de los reactivos clásicos. La enzima utilizada para la reacción fue *Platinum® Taq DNA Polymerase* Brasil (Invitrogen) y se realizó un único ciclo a 72°C durante 10 min. Los fragmentos de ADN purificados se clonaron en pGEM-T Easy (Promega) obteniéndose los plásmidos pGp1499, pGp2125 y pGp2129, respectivamente, los que se subclonaron en los sitios *EcoRI* y *PstI* del vector *shuttle* pWH1266 y se transformó en *E. coli* Top10. Las transformantes se seleccionaron en placas de LB conteniendo tetraciclina (15 µg/ml) y luego se aislaron los plásmidos pWp1499, pWp2125 y pWp2129 los cuales son capaces de replicar en *A. baylyi* ADP1. Las mutantes simples de *A. baylyi* ADP1 (1499KO, 2125KO y 2129KO) y la mutante noqueada triple (B++M3) fueron transformadas naturalmente con 2 µg de cada uno de los plásmidos pWp1499, pWp2125 o pWp2129 como se describió anteriormente (Palmen y col., 1993) y se seleccionaron las colonias en placas de LB conteniendo tetraciclina (15 µg/ml). De esta manera se obtuvieron nueve cepas complementadas para las mutantes noqueadas simples (1499KO-C1499, 1499KO-C2125, 1499KO-C2129, 2125KO-C1499, 2125KO-C2125, 2125KO-C2129, 2129KO-C1499, 2129KO-C2125 y 2129KO-C2129) y tres cepas complementadas para la mutante noqueada triple (B++M3-C1499, B++M3-C2125 y B++M3-C2129) (Tabla 10).

**Análisis transcripcional.** Las muestras utilizadas para el análisis transcripcional se obtuvieron a partir de cultivos en placas del ensayo de motilidad de *twitching*, incubadas a 24°C en oscuridad o bajo luz azul. Seis placas de cada condición, luz u oscuridad, se lavaron con 2 ml de solución RNAlater® (Life Technologies). Las muestras provenientes de las seis placas bajo la misma condición, oscuridad o luz, se combinaron y procesaron como una única muestra. Las muestras “oscuridad” y “luz” se centrifugaron a 5000 x g durante 2 min a 4 °C y en los pellets obtenidos se realizó una extracción de ARN total utilizando el reactivo de Trizol (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del proveedor y los cuidados sugeridos para el trabajo con ARN. Las muestras se conservaron a -80°C (hasta 6 meses) o a -20°C durante un corto plazo.

Las muestras de ARN total se resuspendieron en agua DEPC y se evaluó su integridad por medio de una corrida electroforética en gel de agarosa y se cuantificaron por espectroscopía. Para la

separación del ARN total, las muestras se calentaron previamente a 60°C durante 5 min y se corrieron en un gel de agarosa 1% (p/v) en buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 0,1 mM EDTA, ácido acético glacial c.s.p., pH 8) a un voltaje constante de 40 volts durante 40 min. Para la cuantificación del ARN se midió la absorbancia de cada muestra a 260 y 280 nm. La lectura a 260 nm permitió calcular la concentración del ácido nucleico en la muestra, donde  $DO_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml}$  de ARN. Además, la relación  $DO_{260}/DO_{280}$  permitió estimar la pureza de la muestra, ya que corresponde a la relación ADN y proteínas. Cuando dicho cociente se encontraba entre 1,8 y 2, la muestra contaba con una pureza adecuada y se continuaba con su procesamiento.

Las muestras de ARN total fueron tratadas con ADNasa RQ1 (Promega) durante 3 h a 37°C siguiendo las indicaciones del proveedor. Para evaluar el nivel de expresión (ARNm) correspondiente a los genes ACIAD1499, ACIAD2110, ACIAD2125 y ACIAD2129, a partir de las muestras de ARN total de oscuridad y luz, se realizó una retro-transcripción (RT) con la transcriptasa reversa M-MLV (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor. Muestras sin enzima fueron incluidas como controles negativos de la reacción. Las muestras de ADNc fueron utilizadas tanto para PCR convencional como para qPCR. Las amplificaciones se realizaron con los oligonucleótidos RT1499PF y RT1499PR, RT2110PF y RT2110PR, RT2125PF y RT2125PR, RT2129PF y RT2129PR (Tabla 11) correspondientes a regiones internas de ACIAD1499, ACIAD2110, ACIAD2125 y ACIAD2129, respectivamente. La reacción de PCR convencional luego de la RT (RT-PCR) se realizó bajo las siguientes condiciones: 95°C durante 5 min, 30 ciclos a 95°C durante 45 seg, 55°C durante 45 seg y 72°C durante 1 min. Para el análisis cuantitativo de expresión de los genes ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129, se realizó qPCR en el equipo Mx3005P™ QPCR Systems (Stratagene) utilizando los mismos oligonucleótidos que en la RT-PCR, SYBR *green* como colorante fluorescente y las siguientes condiciones: 95°C durante 5 min; 40 ciclos de 94°C durante 15 seg, 55°C durante 30 seg y 72°C durante 30 seg; finalmente 95°C durante 1 min y 55°C durante 30 seg para obtener la curva de fusión. Se analizaron tres muestras biológicas para cada gen, cada una por triplicado, y los niveles de expresión fueron normalizados con respecto a la expresión del gen *recA* en cada muestra de ARN. Para la evaluación de la expresión de dicho gen se utilizaron los oligonucleótidos RecA\_PF y RecA\_PR (Tabla 11). Los resultados fueron analizados mediante LinRegPCR 11.0 (Ramakers y col, 2003; Ruijter y col., 2009).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

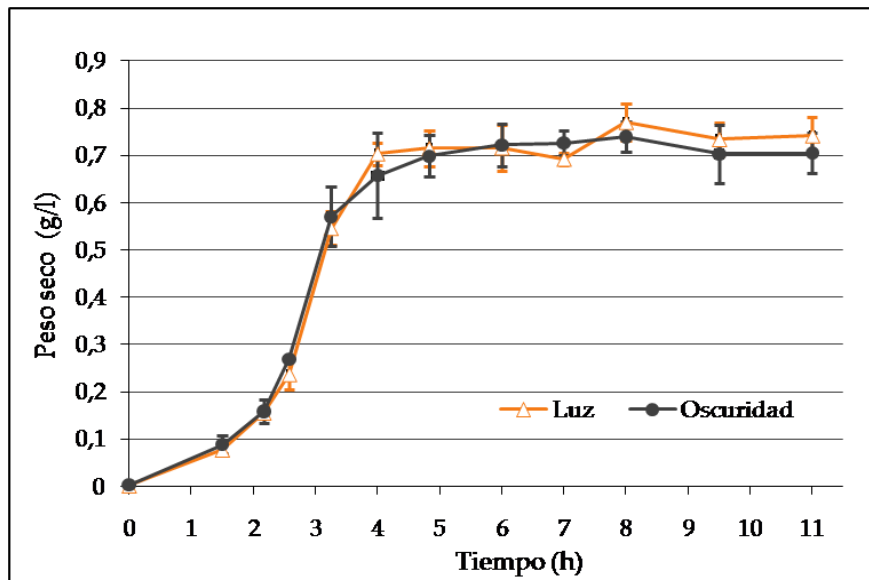
*A. baylyi* ADP1 fue seleccionado como organismo modelo para el análisis de proteínas BLUF debido a que es un organismo no patógeno y presenta características que permiten su fácil manipulación genética, entre las que se destaca la capacidad de ser naturalmente transformable. Además, como *A. baylyi* ADP1 posee en su genoma cuatro secuencias codificantes para proteínas BLUF, el análisis de esta cepa permitió evaluar el significado de la abundancia de dichos genes.

### 1. Estudio de la respuesta a la luz en *A. baylyi* ADP1 e identificación de posibles fenotipos asociados

Con el fin de identificar respuestas asociadas a la presencia de luz, se investigaron un conjunto de fenotipos en condiciones de luz y oscuridad.

#### 1.1. Crecimiento

Para evaluar si el crecimiento de *A. baylyi* ADP1 se encontraba afectado por el efecto de la luz, se realizó una medición comparativa de los niveles de crecimiento en condiciones de luz y oscuridad (Figura 27). Las curvas de crecimiento obtenidas para ambas condiciones mostraron que las



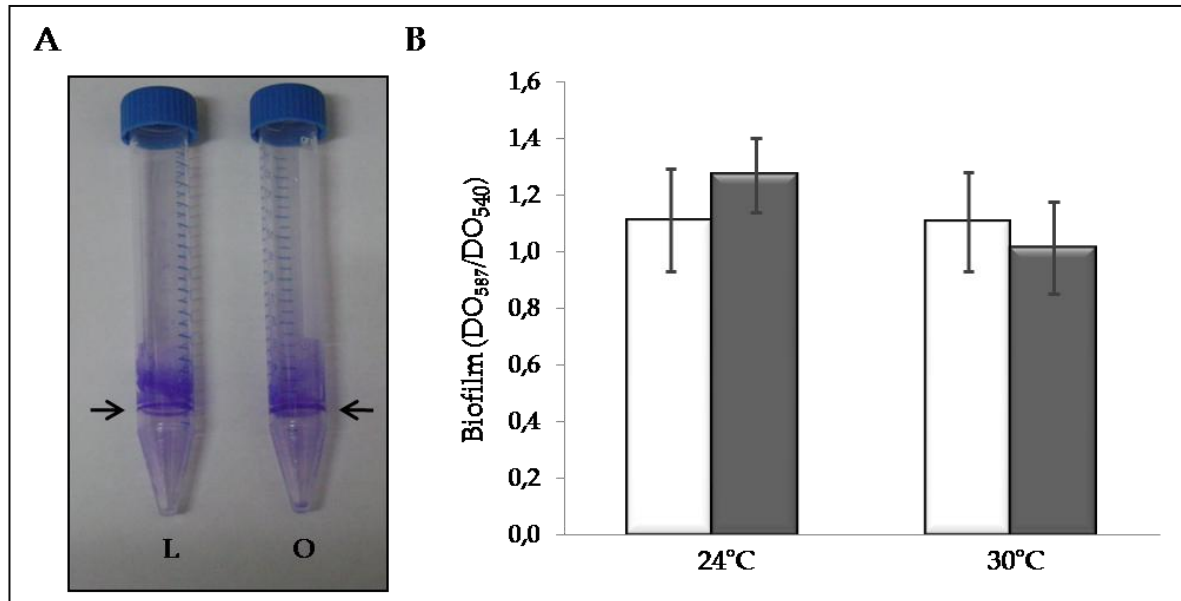
**Figura 27. Curva de crecimiento de *A. baylyi* ADP1 en luz y oscuridad.** El crecimiento se monitoreó por determinación de DO<sub>540</sub> durante 11 h y a partir de una curva DO vs PS se obtuvo el PS (g/l) correspondiente.

diferencias de crecimiento se encontraban dentro del rango del error de medición e indicaron que en las condiciones empleadas el crecimiento de *A. baylyi* ADP1 no se encuentra regulado por luz. Estos resultados son compatibles con el estudio realizado en *A. baumannii*, donde tampoco se observaron diferencias en su crecimiento bajo diferentes condiciones de iluminación (Mussi y col., 2010).

## 1.2. Formación de biofilm

Uno de los fenotipos señalados más asiduamente en la literatura asociado al efecto de la luz en las bacterias quimiotróficas es la formación de biofilm. Debido a que *A. baylyi* ADP1 forma un biofilm muy lábil en superficies hidrofílicas como el vidrio, imposibilitando la tinción con CV, se seleccionó para el ensayo una superficie hidrofóbica (tubos de polipropileno) sobre los cuales el biofilm es estable. Además, el ensayo se realizó a dos temperaturas, 24°C y 30°C, en condiciones de luz y oscuridad. Se observó que *A. baylyi* ADP1 formó efectivamente biofilm sobre las paredes de los tubos, principalmente en la interfase líquido-aire y, lo que es más interesante, por encima de esta interfase (Figura 28A). Debido a que los tubos fueron incubados sin agitación, este fenómeno no podría deberse al movimiento del cultivo, lo que sugiere que *A. baylyi* ADP1 “treparía” por la superficie del tubo. Mediante observación macroscópica no fue posible discernir si existía diferencia en cuanto a la cantidad de biofilm formado en luz y oscuridad. Por lo tanto se realizó la cuantificación del biofilm mediante tinción con CV 1% (p/v) y su correlación con la biomasa total (Figura 28B). Los resultados mostraron que la formación de biofilm en *A. baylyi* ADP1 a 24°C y 30°C no se encuentra afectada por el efecto de la luz, indicando de este modo que la adhesión a superficies abióticas mediada principalmente por el sistema de *pili* tipo I no se encontraría regulado por luz.

Estos resultados difieren de lo reportado para *A. baumannii*, donde la formación de biofilm se inhibe bajo luz azul y al aumentar la temperatura (Mussi y col., 2010). Esto junto a la falta de similitud encontrada al comparar la subunidad mayor del sistema de *pili* implicado en la formación de biofilm en *A. baylyi* y *A. baumannii* (Gohl y col., 2006; ver Introducción: 4.3.1. Biofilm en *A. baylyi* ADP1) podría proporcionar una manera de discriminar entre cepas ambientales y oportunistas de este género. Sin embargo, un análisis más detallado es necesario para corroborar esta hipótesis.



**Figura 28. Formación de biofilm de *A. baylyi* ADP1 en condiciones de luz y oscuridad.** A. Biofilm formado sobre tubos de polipropileno luego de una incubación sin agitación a 30°C durante 4 días en luz (L) u oscuridad (O) y posterior tinción con CV. Las flechas indican el nivel al que llegaba el cultivo y evidencia el efecto de “trepado” sobre dicho nivel. B. Cuantificación del total de biofilm formado en luz (barras blancas) u oscuridad (barras negras) a 24°C y 30°C en muestras ensayadas por quintuplicado. Las barras indican el DS sobre la media.

### 1.3. Expresión del gen *lipA* y síntesis de lipasa

*A. baylyi* ADP1 produce una lipasa extracelular, la cual está codificada por el gen *lipA* (Kok y col., 1995). Para evaluar el efecto de la luz sobre el nivel de expresión del gen *lipA* se realizó la determinación de  $\beta$ -galactosidasa en cultivos de AAC320-1 (cepa que contiene una fusión *lipA::lacZ*) en luz y oscuridad (Kok y col., 1996). La Figura 29 muestra que los niveles de expresión de *lipA* no se modificaron significativamente por acción de la luz. Por otra parte, mediante este experimento se comprobó nuevamente que el crecimiento de la bacteria no varía en condiciones de luz y oscuridad.



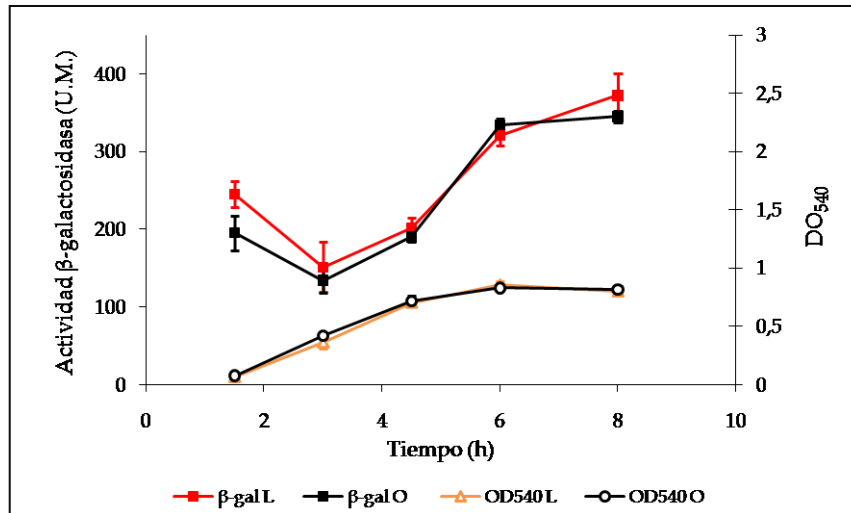


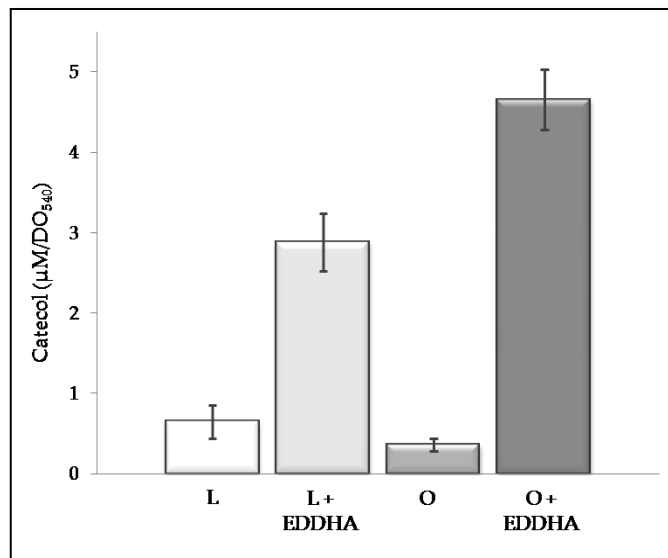
Figura 29. Crecimiento y expresión de *lipA* de AAC320-1 en condiciones de luz y oscuridad. El nivel de expresión del gen *lipA* medido por la producción de β-galactosidasa en cultivos de AAC320-1 (cepa que contiene una fusión *lipA::lac*) crecidos en luz (L) u oscuridad (O).

#### 1.4. Producción de sideróforos de tipo catecol

Anteriormente se demostró que *A. baylyi* ADP1 produce sideróforos de tipo catecol en condiciones de limitación de hierro (Nudel y col., 2001). Con el fin de evaluar el posible efecto de la luz en la producción de estos sideróforos, *A. baylyi* ADP1 fue cultivado en medio con y sin el agregado del quelante de hierro (EDDHA) en condiciones de luz y oscuridad. La Figura 30 muestra el aumento esperado en la producción de catecoles en los cultivos que crecieron en presencia del quelante de hierro tanto en luz como en oscuridad. Lo que es más importante, la producción de catecoles en cultivos que crecieron con quelante en oscuridad fue significativamente mayor que los que lo hicieron en luz. En efecto, mientras que en presencia de luz el agregado de quelante produjo un aumento de 2,23 veces en la producción de catecoles, para los cultivos crecidos en oscuridad el aumento fue de 4,29 veces. Estos resultados demuestran que la luz disminuye la producción de sideróforos tipo catecol en *A. baylyi* ADP1.

En bacterias, la radiación ionizante ( $\gamma$ ) y no ionizante (UV) es capaz de generar un número de especies radicales y peróxidos (especies reactivas del oxígeno, ROS) a través de la ionización intracelular del agua. Además, el hierro es capaz de interactuar con el peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$ ) y generar un estrés oxidativo (Ortiz de Orue Lucana y col., 2012). Si bien se podría hipotetizar que estas reacciones sucedan en medios no limitados en hierro, es decir con exceso de hierro intracelular, se esperaría que la producción de sideróforos de tipo catecol estuviera disminuída en condiciones de luz con respecto

a la oscuridad. Debido a que nuestros resultados mostraron el efecto contrario, esto indica que *A. baylyi* ADP1 debe poseer otro sistema para evitar el estrés oxidativo que genera la acción conjunta de la luz y el exceso de hierro intracelular (como ser el almacenamiento de hierro mediante el sistema Dps). Por otro lado, la disminución en la producción de sideróforos de tipo catecol en medios limitados por acción de la luz, evitaría la generación de un estrés oxidativo en esta condición. Según nuestra información, estos son los primeros resultados en los que se relaciona la producción de sideróforos con el estímulo luminoso.



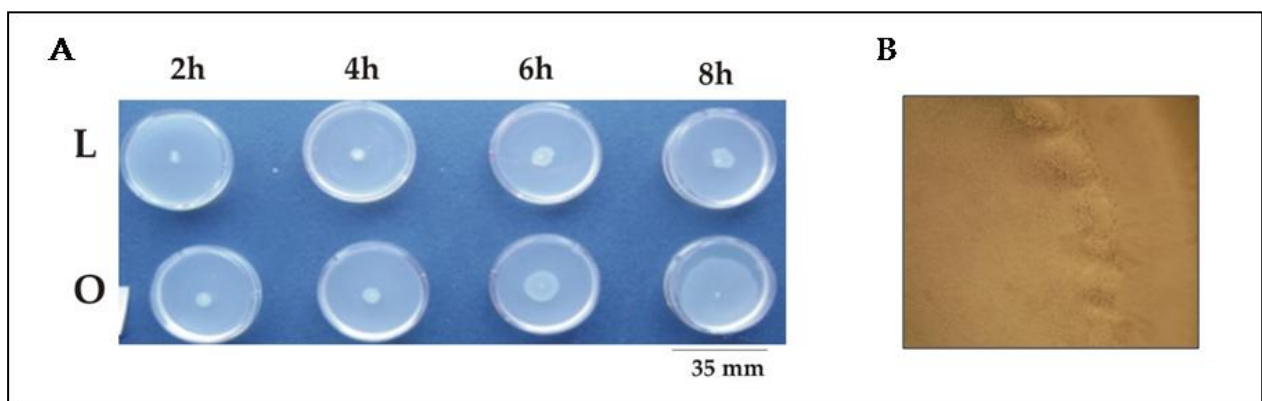
**Figura 30. Producción de sideróforos de tipo catecol en *A. baylyi* ADP1 en condiciones de luz y oscuridad.** Cuantificación de la producción de catecoles en sobrenadantes de cultivos de *A. baylyi* ADP1 crecidos bajo luz blanca (L) u oscuridad (O), en presencia y ausencia de quelante de hierro (EDDHA), (L + EDDHA y O + EDDHA) por el método de Arnow (Arnow, 1973). Las concentraciones de catecoles se obtuvieron mediante una curva de calibración con DHBA y estas se normalizaron a su correspondiente biomasa, expresando los resultados como  $\mu\text{M}/\text{DO}_{540}$ . El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresan como media  $\pm$  DS.

### 1.5. Motilidad tipo *Twitching*

Uno de los mecanismos comprobados que utilizan los microorganismos para adaptarse a los cambios en la luz ambiental es el movimiento (Hoff y col., 2009). La regulación de la motilidad tipo *twitching* por la luz azul fue descrita en *Synechocystis* sp. PCC6803, un organismo capaz de percibir la luz a través de su fotorreceptor PixD y generar una respuesta fototáctica positiva hacia la fuente de luz (Okajima y col., 2005; Hoff y col., 2009). Considerando que *A. baylyi* ADP1 expresa un componente esencial para este movimiento en particular, el *pili* tipo IV (Gohl y col., 2006;

Henrichsen y Blom, 1975), se evaluó el efecto de la luz en este movimiento (Figura 31A). El ensayo demostró que la luz inhibe la motilidad tipo *twitching* en *A. baylyi* ADP1. Por otra parte, las observaciones microscópicas mostraron el patrón de movimiento esperado para la motilidad tipo *twitching* (Henrichsen, 1972) (Figura 31B).

Este resultado fue la primer evidencia de regulación de la motilidad por luz en el género *Acinetobacter* (Hoff y col., 2009) y significó el punto de partida para el estudio de este fenómeno en otros miembros del género tanto por nuestro laboratorio, como por otros grupos de investigación (ver Capítulo 1; Mussi y col., 2010).



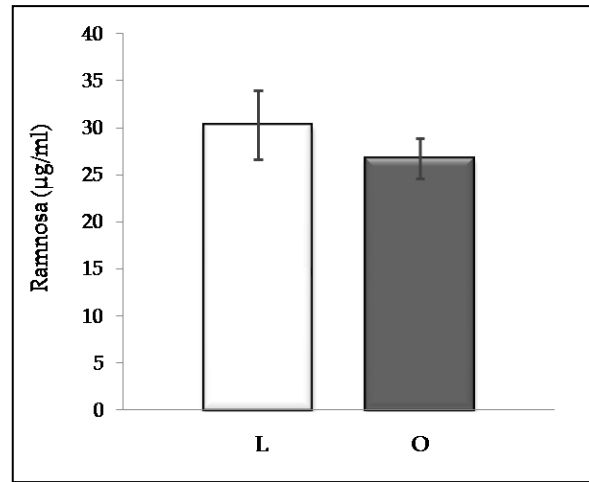
**Figura 31.** Efecto de la luz blanca en el *twitching* de *A. baylyi* ADP1. **A.** Placas de LB blando inoculadas con un palillo estéril conteniendo *A. baylyi* ADP1 e incubadas a 30°C bajo luz blanca (L) u oscuridad (O) durante 2, 4, 6 y 8 h. **B.** Obsevación con microscopio Carl Zeiss con contraste de fase (400X) del borde del halo de *twitching* de *A. baylyi* luego de la incubación en LB blando 30 °C durante 8 h bajo luz blanca.

### 1.6. Producción de polisacáridos de ramnosa

En los cultivos de *A. baylyi* ADP1 donde se manifestó la motilidad tipo *twitching* se observó una zona traslúcida en el agar rodeando el halo, que podría deberse a la secreción de emulsificantes, según ha sido previamente reportado en otros trabajos (Stewart y col., 2009). Considerando que se ha demostrado que la producción de exopolisacáridos se encuentra regulada por luz azul en *Rhizobium leguminosarum* a través de su fotorreceptor LOV-HK (Bonomi y col. 2012), se decidió estudiar la producción de emulsificantes en *A. baylyi* ADP1, en condiciones de luz y oscuridad.

La actividad emulsificante de la cepa microencapsulada *A. baylyi* ADP1 se debe a la formación de un complejo proteína-polisacárido constituido por el principal exopolisacárido producido por esta bacteria, formado por unidades de L-ramnosa y D-glucosa, en una relación 3:1, y proteínas unidas no covalentemente (Kaplan y col., 1987; Kaplan y Rosenberg, 1982). La Figura 32 muestra que la

producción de exopolisacáridos en *A. baylyi* ADP1 no se modificó significativamente por la incidencia de la luz, por lo tanto se especula que este estímulo tampoco modificaría la actividad emulsificante de la cepa.



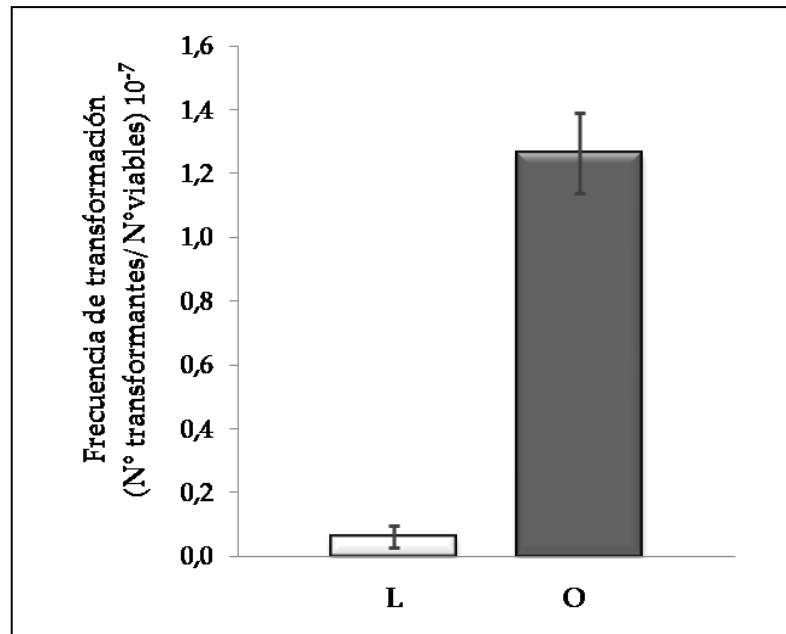
**Figura 32. Concentración de ramnosa en sobrenadantes de *A. baylyi* ADP1 en luz y oscuridad.** A partir de un ensayo de motilidad tipo *twitching* bajo luz blanca (L) u oscuridad (O) se obtuvieron las muestras por lavado total de las placas y se les determinó la concentración de ramnosa de los sobrenadante por el procedimiento de ácido sulfúrico-cisteína (Dische y Shettles, 1948). El ensayo se realizó por sextuplicado y los resultados se expresan como media  $\pm$  DS.

### 1.7. Transformabilidad

Una de las características distintivas de *A. baylyi* ADP1 es su capacidad de ser naturalmente transformable. El transporte de ADN extracelular hacia el compartimiento citoplasmático es un proceso complejo (Burton y Dubnau, 2010) y se ha demostrado que existen entre 30 y 80 sitios en la superficie celular de *A. baylyi* ADP1 que participan en una unión no covalente con el ADN exógeno previo a su captación (Thomas y Nielsen, 2005). Hasta el momento se han identificado 16 genes implicados en la competencia de *A. baylyi* ADP1: *comA*, *comEA*, *dprA*, *comP*, *comE*, *comF*, *comB*, *comC*, *pilD*, *pilC*, *pilB*, *comQ*, *comL*, *comM*, *comN* y *comO* (Averhoff y Graf, 2008). Mientras que los primeros tres genes codifican para proteínas específicas para la traslocación del ADN, el resto de los genes corresponden a proteínas relacionadas con el *pili* tipo IV. Debido a la similitud de las proteínas implicadas en el proceso de captación de ADN, como las que forman el *pili* tipo IV, es atractivo considerar un único mecanismo para ambos procesos. Sin embargo, estudios realizados en mutantes noqueadas en uno o más de los genes *comB*, *comE*, *comF* y *comP* mostraron un *pili* intacto y funcional (Busch y col., 1999; Herzberg y col., 2000; Porstendorfer y col., 1997), lo que sugiere que la existencia de un *pili* tipo IV funcional no es suficiente para la captación del ADN.

Sin embargo, la participación del *pili* tipo IV en la captación del ADN no ha sido actualmente comprobada.

Considerando que la motilidad tipo *twitching* está regulada por luz y que su motor, el *pili* tipo IV, podría también participar en la captación del ADN exógeno, se decidió evaluar la frecuencia de transformación de esta cepa en luz y oscuridad. La Figura 33 muestra que la frecuencia de transformación es significativamente mayor en oscuridad que en luz. Considerando que tanto la motilidad tipo *twitching* como la transformabilidad resultaron afectadas en el mismo sentido bajo la incidencia de la luz, podría sugerirse que la luz provocaría una disminución en la actividad y/o formación del *pili* tipo IV, generando una disminución de la motilidad y de la captación del ADN exógeno. Por lo tanto, nuestros resultados avalarían preliminarmente la teoría que propone la participación del *pili* tipo IV en el proceso de transformación en *A. baylyi* ADP1.



**Figura 33. Frecuencia de transformación de *A. baylyi* ADP1 en luz y oscuridad.** Cultivos de *A. baylyi* ADP1 crecidos en luz (L) u oscuridad (O) se transformaron según la técnica descrita por Palmen (Palmen y col., 1993) y se mantuvo la condición (L u O) hasta el final del ensayo. Para más detalles ver Materiales y métodos.

Los resultados del estudio de la regulación por luz de los procesos fisiológicos evaluados en *A. baylyi* ADP1 se resume en la Tabla 12. Se demostró que la producción de sideróforos del tipo catecol, la frecuencia de transformación y la motilidad tipo *twitching* se encontraban inhibidos/reducidos en presencia de luz. Considerando a la incidencia de la luz como una situación de estrés, nuestros resultados evidencian que la luz limita a *A. baylyi* ADP1 a responder a

otras situaciones de estrés como es la escasez de hierro, ya que produce la reducción de la producción de sideróforos del tipo catecol. También, la disminución de la motilidad tipo *twitching* y de la transformabilidad natural, que podrían explicarse por una reducida actividad del *pili* tipo IV causada por efecto de la luz, limitan a *A. baylyi* ADP1 en su capacidad de respuesta ante situaciones de estrés, ya sea mediante el movimiento o bien la adquisición de ADN exógeno que le confiera propiedades adicionales ventajosas.

El fenotipo de motilidad tipo *twitching* fue seleccionado para su posterior estudio, debido a la practicidad del ensayo. Además, estudios recientemente realizado en *A. baumannii* (Mussi y col., 2010; Clemmer y col., 2011; McQueary y col., 2012) permitirán la comparación del movimiento de una cepa ambiental con una patógena oportunista.

**Tabla 12. Respuesta a la luz de procesos fisiológicos en *A. baylyi* ADP1**

| Proceso fisiológico  | Respuesta a 30°C             |              |
|--|------------------------------|--------------|
|  | Luz                          | Oscuridad    |
| Crecimiento  | Sin diferencia luz/oscuridad |              |
| Formación de biofilm (DO <sub>587</sub> /DO <sub>540</sub> ) | 1,10 ± 0,18                  | 1,01 ± 0,16  |
| Expresión de <i>lipA</i>                                     | Sin diferencia luz/oscuridad |              |
| Producción de catecol (µM/DO <sub>540</sub> )*               | 2,88 ± 0,36                  | 4,65 ± 0,37  |
| Motilidad- diámetro (cm) a las 8 hs                          | 0,68 ± 0,11                  | 2,53 ± 0,04  |
| Producción de ramnosa (µg/ml)                                | 30,27 ± 3,66                 | 26,74 ± 2,13 |
| Frecuencia de transformación (10 <sup>-7</sup> )             | 0,06 ± 0,03                  | 1,26 ± 0,13  |

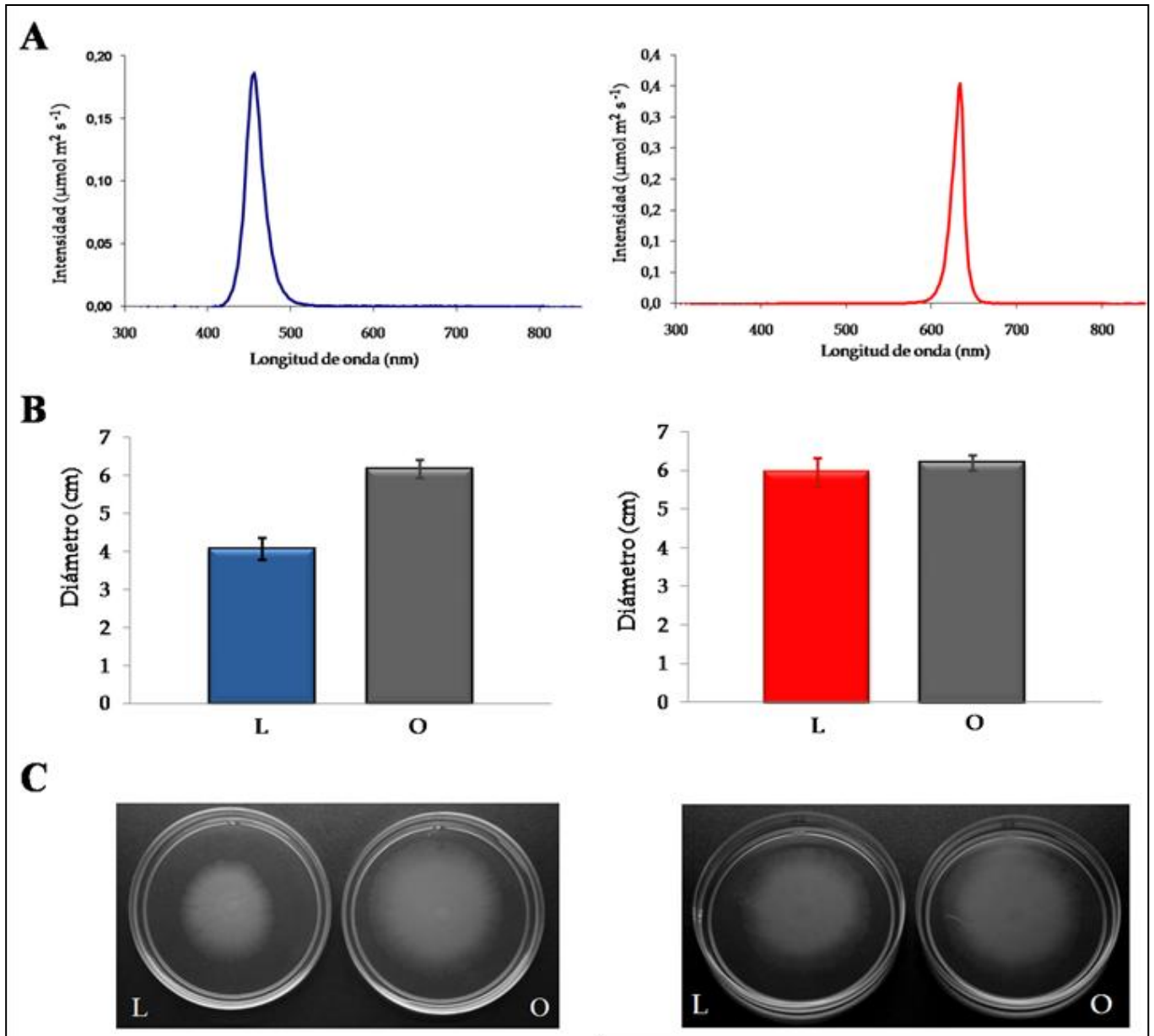
\* Producción de sideróforos de tipo catecol en medio con limitación de hierro (400 µM EDDHA)

## 2. Evaluación del efecto de factores ambientales en la motilidad tipo *twitching*

### 2.1. Especificidad de la longitud de onda

A partir de la observación de que la motilidad tipo *twitching* en *A. baylyi* ADP1 se encuentra inhibida por la luz visible, se analizó la especificidad del fenómeno en relación a la longitud de onda utilizada. Para ello se realizaron los experimentos bajo luz roja y azul, utilizando la metodología descrita en Materiales y métodos. La Figura 34A muestra el análisis espectral de las luces LED azules (izquierda) y rojas (derecha) utilizadas en la iluminación de las placas. Los resultados indicaron que la motilidad tipo *twitching* de *A. baylyi* ADP1 se inhibe específicamente por la luz azul, lo cual era esperado debido a que *A. baylyi* ADP1 posee cuatro secuencias putativas

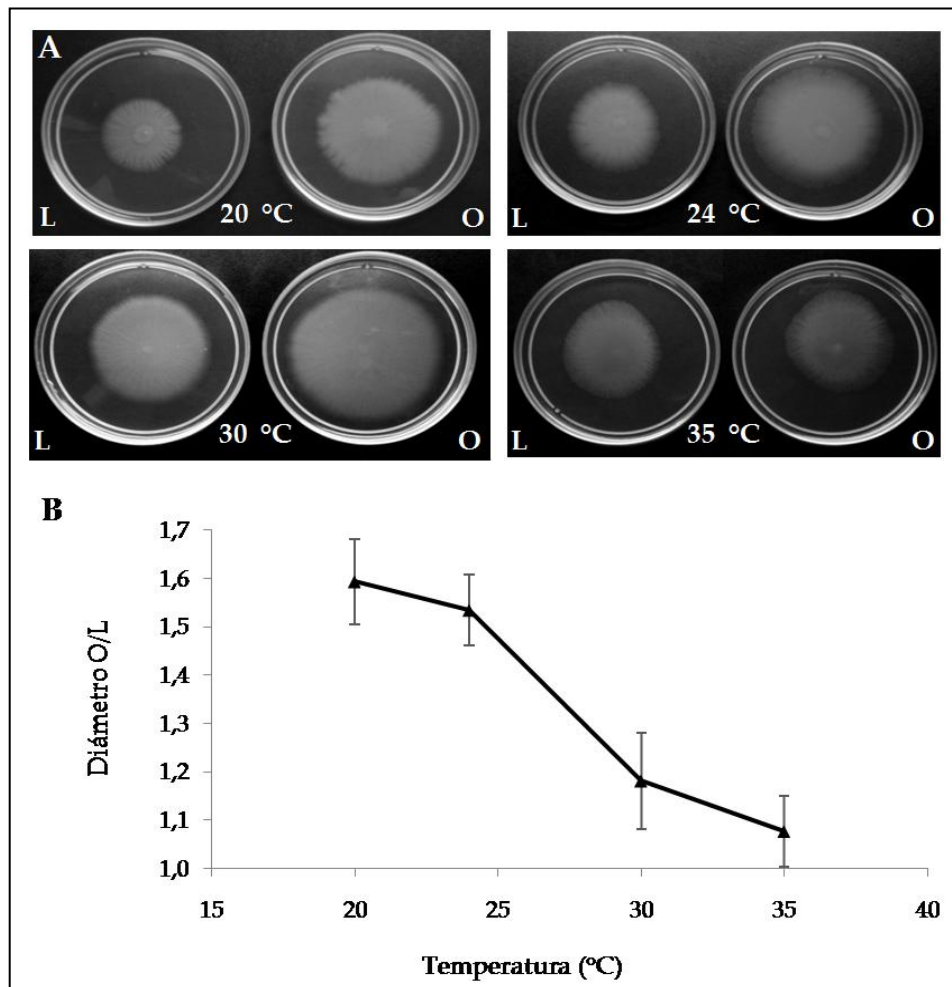
codificantes para proteínas conteniendo BLUF que absorberían a esta longitud de onda (Figura 34B y 34C).



**Figura 34.** Efecto de la luz azul y roja en la motilidad tipo *twitching* de *A. baylyi* ADP1. **A.** Análisis espectral de las luces LED azules (izquierda) y rojas (derecha) realizado con el espectroradiómetro LI-COR LI-1800. **B.** Placas de *twitching* que fueron inoculadas con 3  $\mu\text{l}$  de cultivo de *A. baylyi* ADP1 e incubadas en oscuridad (barras grises) o bajo luz azul (barra azul) o luz roja (barra roja) a 24°C durante 15 h. Luego se midieron los diámetros de los triplicados, se calculó la media  $\pm$  DS y se fotografiaron las placas (C).

## 2.2. Efecto de la temperatura

Con el fin de evaluar el efecto de la temperatura en la motilidad tipo *twitching* de *A. baylyi* ADP1, se realizó el ensayo a cuatro temperaturas (20°C, 24°C, 30°C y 35°C). La Figura 35 muestra que cuando el ensayo se realizó a 30°C o 35°C, la relación de los diámetros obtenidos en oscuridad y luz (O/L) era cercana a 1, lo que sugiere un efecto moderado de la luz azul en la motilidad tipo *twitching* en estas condiciones. Sin embargo, al realizar el ensayo a 20°C o 24°C la relación O/L aumentó a un 1,5 y 1,6, respectivamente, lo que indicó que la inhibición del movimiento por la luz azul era más significativa y más fácil de medir a menores temperaturas. Teniendo en cuenta estos resultados se decidió realizar todos los ensayos sucesivos a 24°C, ya que esta temperatura permitía evidenciar el fenotipo a 15 h y esta temperatura también fue seleccionada para los experimentos realizados en *A. baumannii* (Mussi *et al.*, 2010), lo que permitiría realizar futuras comparaciones.

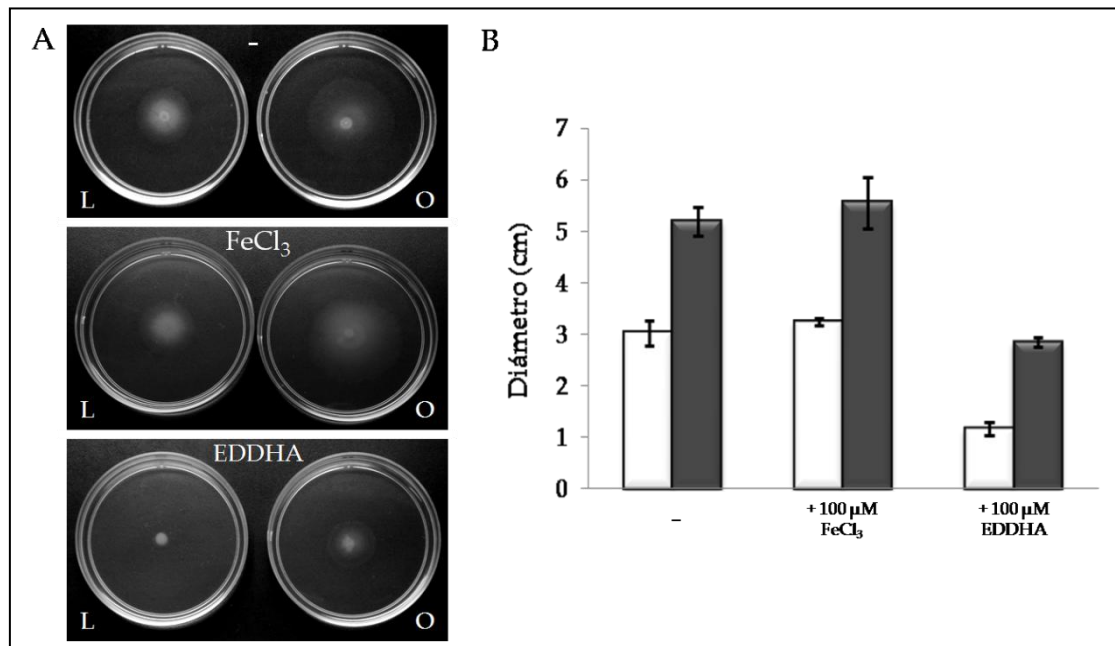


**Figura 35.** Efecto de la luz azul y la temperatura en la motilidad tipo *twitching* en *A. baylyi* ADP1. **A.** Las placas fueron inoculadas con 3  $\mu$ l de *A. baylyi* ADP1 en crecimiento exponencial ( $DO_{600}$ : 0,3) e incubadas bajo luz azul (L) u oscuridad (O) a 20°C, 24°C, 30°C o 35°C durante 48 h, 15 h, 15 h o 9 h, respectivamente. **B.** Relación de los diámetros obtenidos en oscuridad y luz a diferentes temperaturas.



### 2.3. Efecto del hierro

Ensayos realizados en *P. aeruginosa* demostraron que los niveles de hierro modifican la motilidad tipo *twitching* en este patógeno oportunista. Es así que medios de cultivo con limitación de hierro produjeron una disminución en la formación de biofilm y como consecuencia un aumento en la motilidad tipo *twitching* (Patriquin y col., 2008). Además, un estudio transcriptómico realizado en *A. baumannii* demostró que en condiciones de limitación de hierro la expresión de los genes correspondientes al *pili* tipo IV se encuentra disminuída (Eijelkamp y col., 2011). Con el objetivo de evaluar el efecto del hierro en la motilidad de *A. baylyi* ADP1 se realizó el ensayo en placas de *twitching* sin agregados o conteniendo 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  (exceso de hierro) o 100  $\mu\text{M}$  EDDHA (limitación de hierro). La Figura 36 muestra que el agregado de hierro no produjo cambios significativos en la motilidad tipo *twitching* de *A. baylyi* ADP1. Sin embargo, la adición de un quelante de hierro (EDDHA) produjo una disminución significativa de la motilidad tipo *twitching* tanto en luz como en oscuridad, mostrando un resultado concordante con lo descrito para *A. baumannii* (Eijelkamp y col., 2011). Por otro lado, el efecto inhibitorio de la luz no se afectó por el



**Figura 36. Efecto del hierro y la luz azul en la motilidad tipo *twitching* en *A. baylyi* ADP1.** A. Placas de *twitching* sin agregados (-) o conteniendo 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$  ( $\text{FeCl}_3$ ) o 100  $\mu\text{M}$  EDDHA (EDDHA) inoculadas con 3  $\mu\text{l}$  de *A. baylyi* ADP1 ( $\text{DO}_{600}$ : 0,3) e incubadas bajo luz azul (L) u oscuridad (O) a 24°C durante 15 h. B. Diámetros de la motilidad tipo *twitching* luego de la incubación bajo luz azul (barras blancas) u oscuridad (barras grises) a 24°C durante 15 h. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresan como media  $\pm$  DS.

cambio de la disponibilidad del hierro. Más aún, la relación entre los diámetros (O/L) en las tres condiciones de cultivo se mantuvo en la misma relación (O/L ~ 2), indicando que no existe un efecto aditivo entre ambos estímulos (luz azul y disponibilidad de hierro). Sin embargo, dado que la respuesta de motilidad tipo *twitching* se encuentra regulada tanto por luz como por la disponibilidad de hierro, la cual depende de la producción de sideróforos también regulada por luz (ver página 102), no puede descartarse una interacción entre la luz, la disponibilidad de hierro y la producción de sideróforos con la respuesta global de motilidad tipo *twitching*.

Hemos demostrado que la motilidad tipo *twitching* de *A. baylyi* ADP1 se encuentra inhibida específicamente por la luz azul y que la disminución de la temperatura acentúa la intensidad de dicha respuesta. Por otro lado, la limitación de hierro produjo una disminución de la motilidad tipo *twitching* tanto en luz como en oscuridad. Todos estos resultados sugieren que condiciones de estrés tales como la incidencia de la luz azul, bajas temperaturas y la limitación de hierro, producen una inhibición de la motilidad tipo *twitching* en *A. baylyi* ADP1, lo cual también ha sido recientemente descrito para la motilidad en *A. baumannii* (Mussi y col., 2010; McQueary y col., 2012).

### **3. Obtención de mutantes noqueadas en genes codificantes para proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 y su evaluación geno/fenotípica**

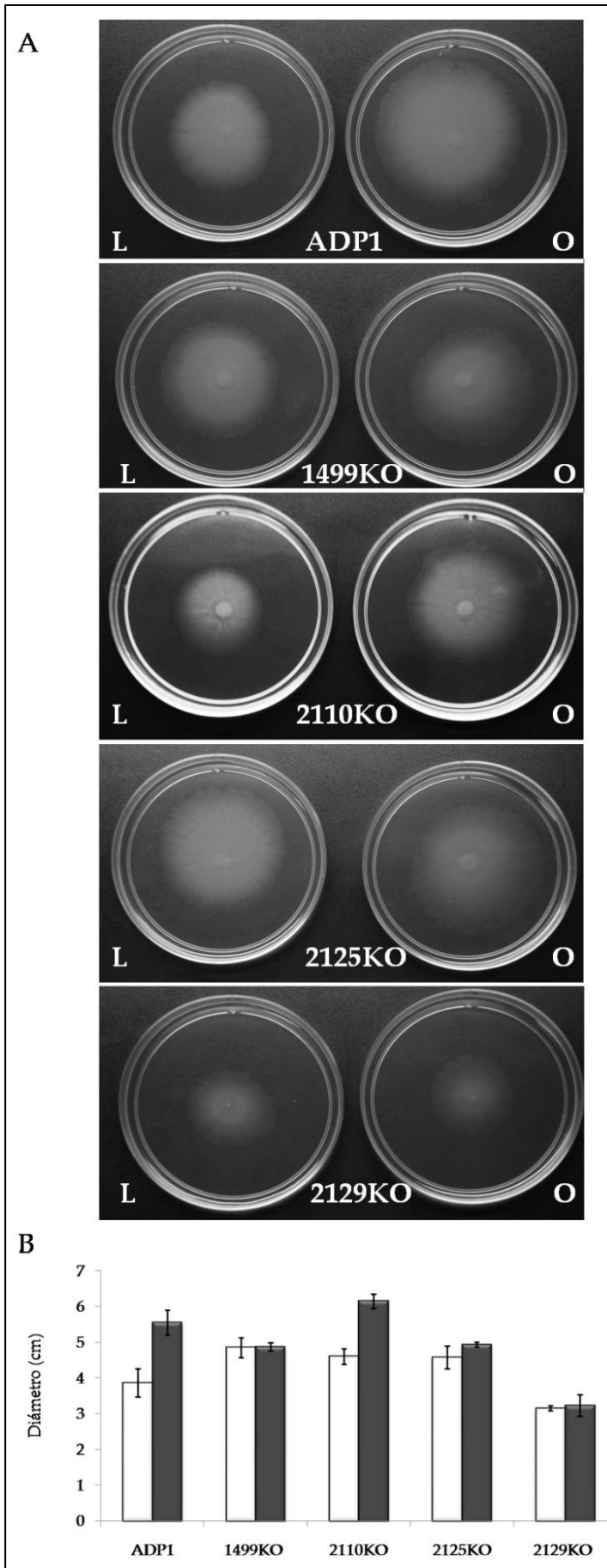
#### **3.1. Construcción de mutantes noqueadas simples en genes codificantes para proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 y estudio de la motilidad tipo *twitching***

Con el objeto de evaluar la posible funcionalidad de los genes codificantes para proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 se construyeron mutantes noqueadas en cada uno de los genes y se comparó la motilidad tipo *twitching* de las mismas en condiciones de luz y oscuridad en estas con respecto a la correspondiente a la cepa salvaje. Como se esquematizó en la Figura 25 (Materiales y métodos), a partir de ADN genómico de *A. baylyi* ADP1 se amplificaron los segmentos internos de los genes ACIAD1499, ACIAD2110 y ACIAD2125 y se clonaron en el vector pGEM-3zf(+). Luego, a cada construcción se le introdujo un gen de resistencia a kanamicina dando como resultado los plásmidos pAMB6K, pAMB7K y pAMB8K, respectivamente. *A. baylyi* ADP1 fue transformada con cada plásmido y se seleccionaron las transformantes por su resistencia a kanamicina, obteniéndose

las mutantes noqueadas 1499KO, 2110KO y 2125KO. La mutante simple en ACIAD2129 se obtuvo de otra fuente y se denominó 2129KO (de Berardinis y col., 2008). Como indica la Figura 37 el fenotipo de inhibición de la motilidad tipo *twitching* por luz azul se anuló en las mutantes 1499KO, 2125KO y 2129KO, mientras que 2110KO mantuvo el fenotipo de la cepa salvaje. De estos resultados se pudo concluir que las proteínas BLUF codificadas por los genes ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129 son activas y se encuentran involucradas en la regulación de la motilidad tipo *twitching*, mientras que ACIAD2110 no participaría en la regulación de este fenotipo.

### **3.2. Construcción de mutantes noqueadas en múltiples genes codificantes para proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 y estudio de la motilidad tipo *twitching***

Para evaluar el efecto de las tres proteínas BLUF en el fenotipo de inhibición de la motilidad tipo *twitching* por luz, se construyó una mutante doblemente noqueada en los genes involucrados (ACIAD1499 y ACIAD2125) y una mutante triple, noqueada en tres de los genes codificantes para dichas proteínas (ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129). Mediante la inserción del plásmido pK1499 en el gen ACIAD1499 y la posterior escisión de dicho gen junto con el plásmido se obtuvo la primer mutante noqueada por delección de ACIAD1499 (B++M1, Tabla 10). Sobre esta mutante se realizó la transformación con pK2125, se siguió el mismo procedimiento para producir la inserción de pK2125 y la posterior escisión del gen ACIAD2125 junto con el plásmido y se obtuvo la mutante doblemente noqueada (B++M2, Tabla 10). Para construir la mutante noqueada triple (B++M3, Tabla 10), se transformó B++M2 con pK2129 y se siguió el mismo procedimiento para producir la inserción de pK2129 y la posterior escisión del gen ACIAD2129 junto con el plásmido. La Figura 38 muestra que la mutante simple (B++M1), al igual que la mutante 1499KO anula el fenotipo de inhibición de la motilidad tipo *twitching* por luz azul. Como se esperaba la mutante doble (B++M2), sin los genes ACIAD1499 y ACIAD2125, y la triple (B++M3), sin los tres genes activos (ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129), mostraron el mismo fenotipo que la mutante simple, no observándose la inhibición de la motilidad tipo *twitching* bajo luz azul. Es importante destacar que B++M3 sólo posee al gen ACIAD2110 activo, lo que permitió confirmar que esta proteína BLUF no se encuentra involucrada en la inhibición de la motilidad tipo *twitching* mediada por luz azul y bien podría encontrarse involucrada en la regulación de otro fenotipo.



**Figura 37. Efecto de la luz azul en la motilidad tipo *twitching* en *A. baylyi* ADP1 y sus mutantes simples.**

**A.** Placas de *twitching* inoculadas con 3  $\mu$ l de *A. baylyi* ADP1, 1499KO, 2110KO, 2125KO o 2129KO en crecimiento exponencial ( $DO_{600}$ : 0,3) e incubadas bajo luz azul (L) u oscuridad (O) a 24°C durante 15 h. **B.** Diámetros de la motilidad tipo *twitching* luego de la incubación bajo luz azul (barras blancas) u oscuridad (barras grises) a 24°C durante 15 h. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresan como media  $\pm$  DS.

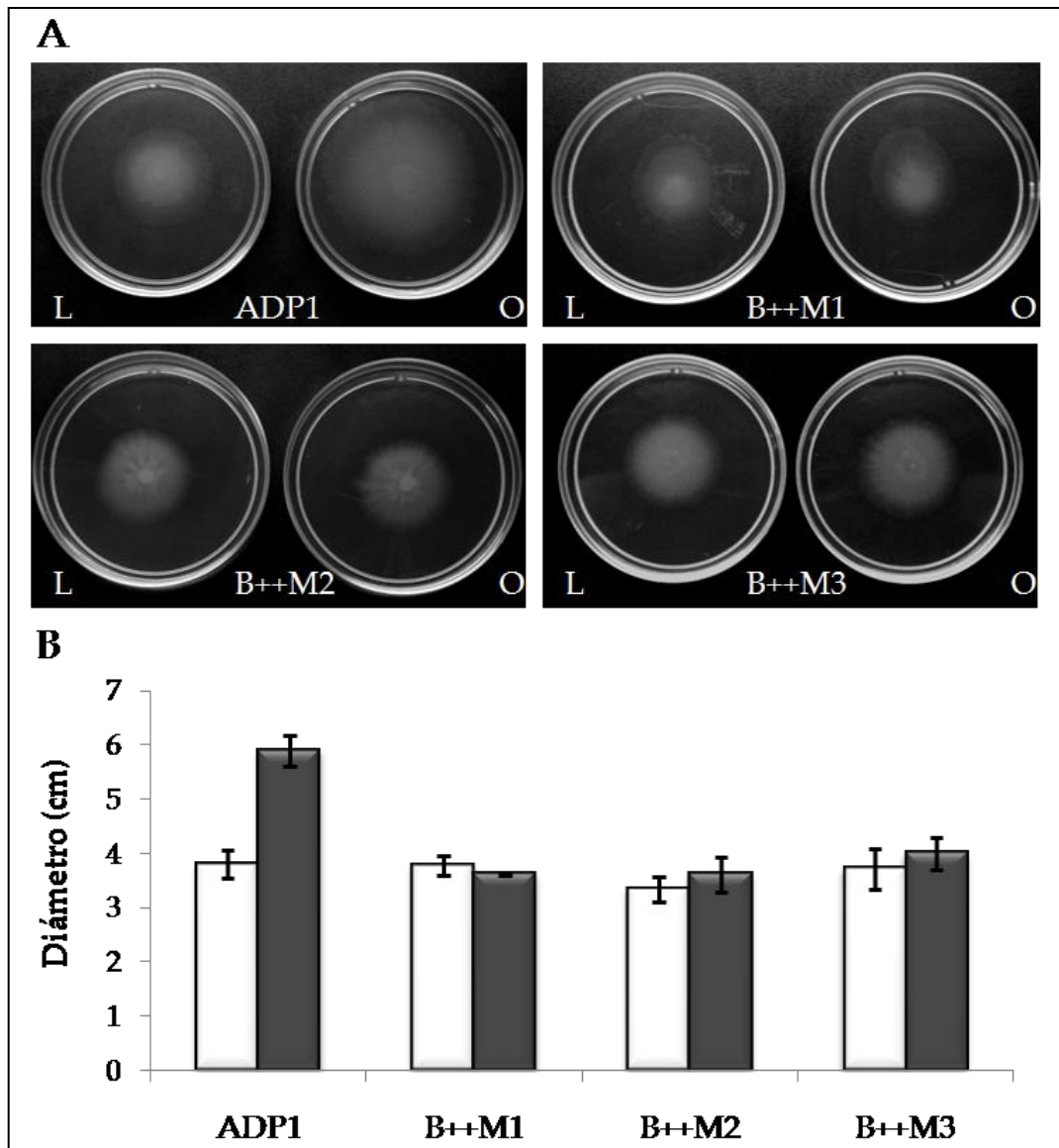


Figura 38. Efecto de la luz azul en la motilidad tipo *twitching* de *A. baylyi* ADP1 y las mutantes noqueadas simple (B++M1), doble (B++M2) y triple (B++M3). A. Placas de *twitching* inoculadas con 3  $\mu$ l de *A. baylyi* ADP1, B++M1 (con delección del gen ACIAD1499), B++M2 (con delección de los genes ACIAD1499 y ACIAD2125) o B++M3 (con delección de los genes ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129) en crecimiento exponencial ( $DO_{600}$ : 0,3) e incubadas bajo luz azul (L) u oscuridad (O) a 24 °C durante 15 h. B. Diámetros del *twitching* luego de la incubación bajo luz azul (barras blancas) u oscuridad (barras grises) a 24°C durante 15 h. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresan como media  $\pm$  DS.

#### 4. Complementación de mutantes noqueadas de *A. baylyi* ADP1 y estudio de la motilidad tipo *twitching*

Los resultados hasta aquí obtenidos evidenciaron que las tres proteínas conteniendo BLUF codificadas por ACIAD1499, ACIAD1225 y ACIAD2129 eran necesarias para producir la

inhibición de la motilidad tipo *twitching* por luz azul en *A. baylyi* ADP1. Una de las explicaciones para estos resultados sería que estas tres proteínas fuesen fundamentales para la formación de un complejo que permitiera la captación de la luz y desencadene una señalización que culmine en la inhibición de la motilidad tipo *twitching*. Para evaluar esta hipótesis cada mutante simple fue complementada con los tres plásmidos que llevaban cada uno de los genes junto a su promotor nativo y de esta manera se obtuvieron las nueve cepas complementadas (1499KO-C1499, 1499KO-C2125, 1499KO-C2129, 2125KO-C1499, 2125KO-C2125, 2125KO-C2129, 2129KO-C1499, 2129KO-C2125 y 2129KO-C2129) (Tabla 10). Como se muestra en las Figuras 39A, 39B y 39C, las tres mutantes simples al ser complementadas con cualquiera de los tres plásmidos que expresan las proteínas BLUF (pWp1499, pWp2125 or pWp2129) revirtieron el fenotipo de la mutante al de la cepa salvaje, mostrando inhibición de la motilidad tipo *twitching* bajo luz azul. Estos resultados indican en principio que las tres proteínas son activas y que si bien son necesarias para la inhibición por luz, estas pueden compensarse unas a otras en esta propiedad y revertir el fenotipo de las mutantes simples al de la cepa salvaje. Estos resultados refutan la hipótesis de la formación de un complejo formado por las tres proteínas. Además, todas las cepas complementadas mostraron una mayor inhibición del *twitching* bajo luz azul (relación diámetro luz/oscuridad) en comparación con la cepa salvaje, lo que sugeriría que el hecho de que las tres proteínas sean necesarias para generar el fenotipo podría deberse al bajo nivel de expresión de los genes individuales. Para corroborar esta hipótesis la mutante noqueada triple (B++M3), carente de fotorreceptores involucrados en la regulación de la motilidad tipo *twitching*, fue complementada con los tres plásmidos que expresan las proteínas BLUF (pWp1499, pWp2125 or pWp2129) y se obtuvieron las tres cepas complementadas (B++M3-C1499, B++M3-C2125, B++M3-C2129) (Tabla 10). Se demostró que estas tres cepas complementadas eran capaces de revertir el fenotipo de la mutante al de la cepa salvaje (Figura 39D). Estos resultados demostraron que una única proteína BLUF sería capaz de desencadenar la inhibición de la motilidad tipo *twitching* bajo luz azul, confirmando tanto la redundancia de los tres genes codificantes para proteínas BLUF (ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129) como la hipótesis que postula que la necesidad de las tres proteínas para desencadenar la inhibición de la motilidad en *A. baylyi* ADP1 podría deberse a los bajos niveles de expresión de sus respectivos genes. A fin de reafirmar esta hipótesis se estudió el nivel de expresión de los tres genes codificantes para proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1.

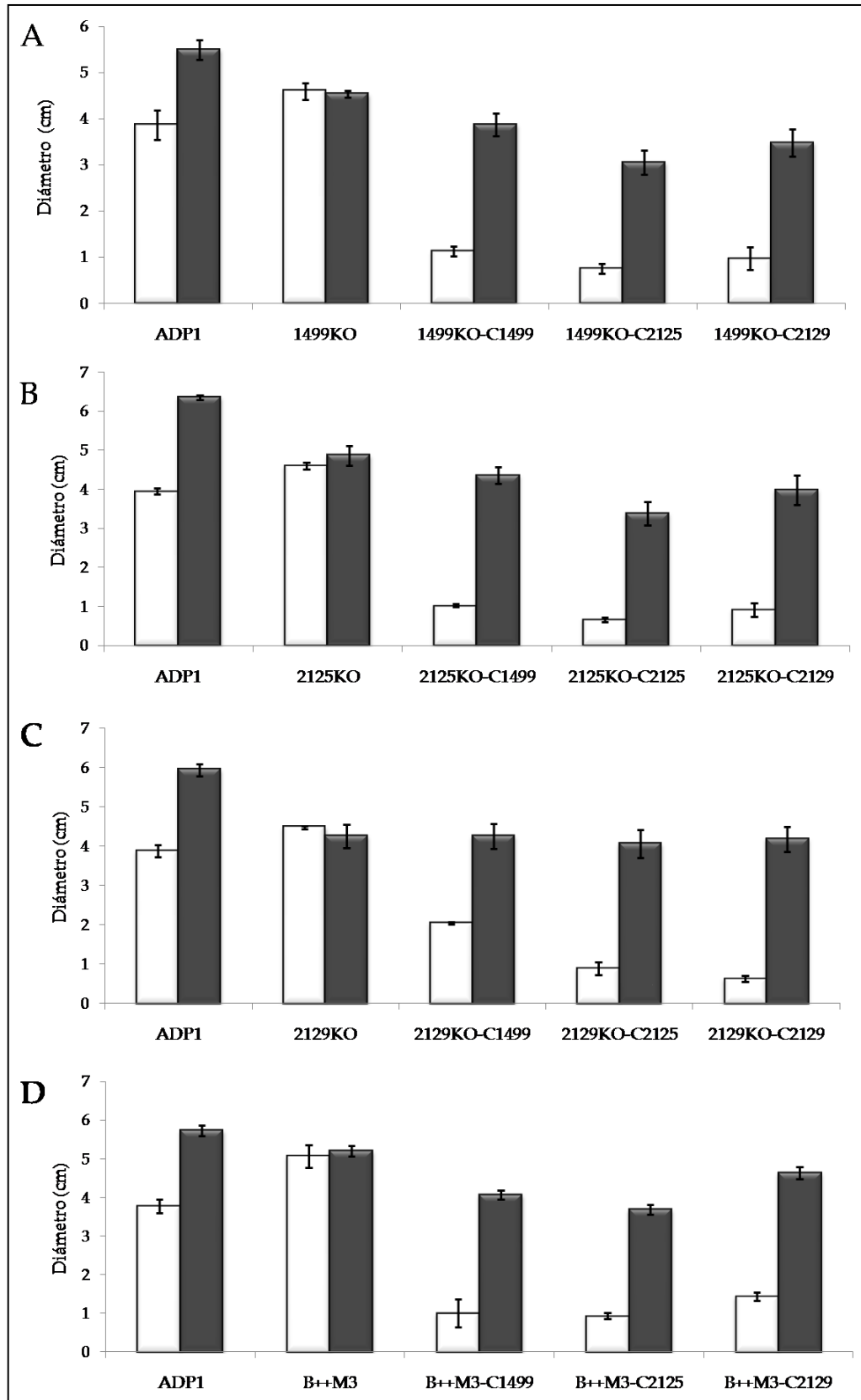


Figura 39. Efecto de la luz azul en la motilidad tipo *twitching* de *A. baylyi* ADP1, sus mutantes noqueadas simples, su mutante triple y cepas complementadas. A. Diámetros de la motilidad tipo *twitching* de *A. baylyi* ADP1, 1499KO, 1499KO-C1499, 1499KO-C2125 and 1499KO-C2129 luego de la incubación bajo luz azul (barras blancas) u oscuridad (barras grises) a 24°C durante 15 h para *A. baylyi*

ADP1 y 21 h para la mutante noqueadas y cepas complementadas. **B.** El mismo ensayo que en (A.) pero utilizando las cepas *A. baylyi* ADP1, 2125KO, 2125KO-C1499, 2125KO-C2125 y 2125KO-C2129. **C.** El mismo ensayo que en (A.) pero utilizando las cepas *A. baylyi* ADP1, 2129KO, 2129KO-C1499, 2129KO-C2125 y 2129KO-C2129. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como media  $\pm$  DS. **D.** El mismo ensayo que en (A.) pero utilizando las cepas *A. baylyi* ADP1, B++M3, B++M3-C1499, B++M3-C2125 y B++M3-C2129. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como media  $\pm$  DS.

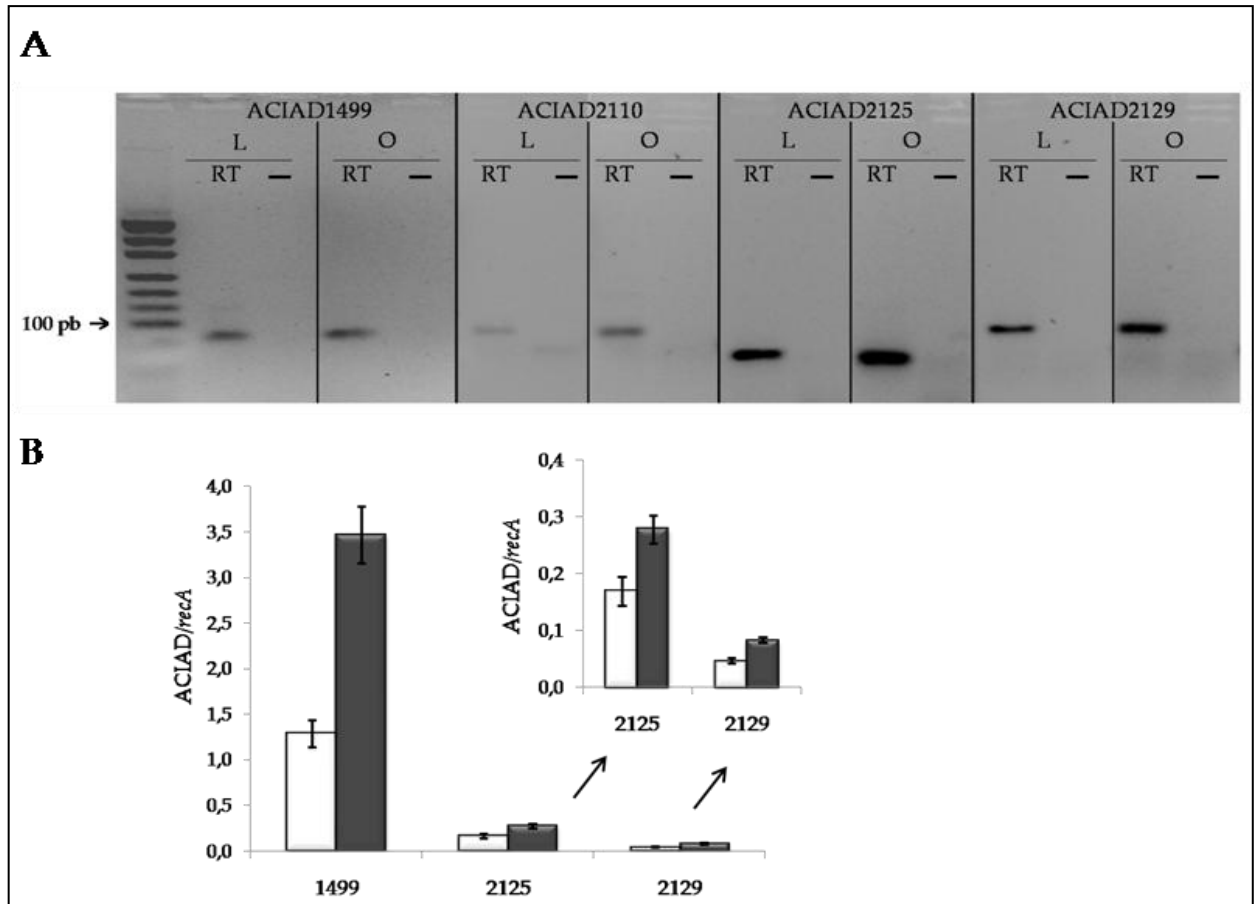
## **5. Análisis de la expresión de los cuatro genes codificantes para proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 bajo condiciones de luz y oscuridad**

La expresión de los cuatro genes codificantes para proteínas BLUF en *A. baylyi* ADP1 se evaluó a partir de células obtenidas de ensayos de motilidad tipo *twitching* bajo luz azul u oscuridad. A dichas muestras se les realizó la extracción del ARN total y para evaluar la expresión (ARNm) correspondiente a los genes ACIAD1499, ACIAD2110, ACIAD2125 y ACIAD2129 se realizó RT-PCR. Los resultados de la reacción fueron evaluados por corrida electroforética en gel de agarosa (Figura 40A) y evidenciaron que los cuatro genes son expresados tanto en condiciones de luz como en oscuridad.

Para el análisis cuantitativo de la expresión de los genes ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129, se realizó qPCR y los niveles de expresión fueron normalizados con respecto a la expresión de *recA* en cada muestra de ARN. Los resultados del análisis cuantitativo de los transcritos necesarios para la inhibición de la motilidad tipo *twitching* bajo luz azul (ACIAD1499, ACIAD2125 ACIAD2129) se muestran en la Figura 40B. Se observó que los niveles de expresión (ARNm) de los tres genes fue mayor en oscuridad que en luz, con una relación oscuridad/luz de  $2,69 \pm 0,39$  para ACIAD1499,  $1,65 \pm 0,28$  para ACIAD2125 y  $1,79 \pm 0,21$  para ACIAD2129. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Mussi, en los que se muestra que la luz produce una disminución en la expresión del gen *blsA* de *A. baumannii* a 24°C (Mussi y col., 2010). En *A. baylyi* ADP1 los bajos niveles de expresión de los genes codificantes para proteínas BLUF bajo luz azul podrían explicar la necesidad de que los tres genes sean expresados con el fin de alcanzar la cantidad de fotorreceptor necesaria para provocar la inhibición de la motilidad tipo *twitching*. Además, esto explicaría la mayor inhibición del movimiento producido en las cepas complementadas con pWp1499, pWp2125 o pWp2129 con respecto a la cepa salvaje, debido a los mayores niveles de expresión de los fotorreceptores a partir de los plásmidos. Considerando que los niveles de expresión de ACIAD1499 bajo condiciones de luz fueron significativamente mayores



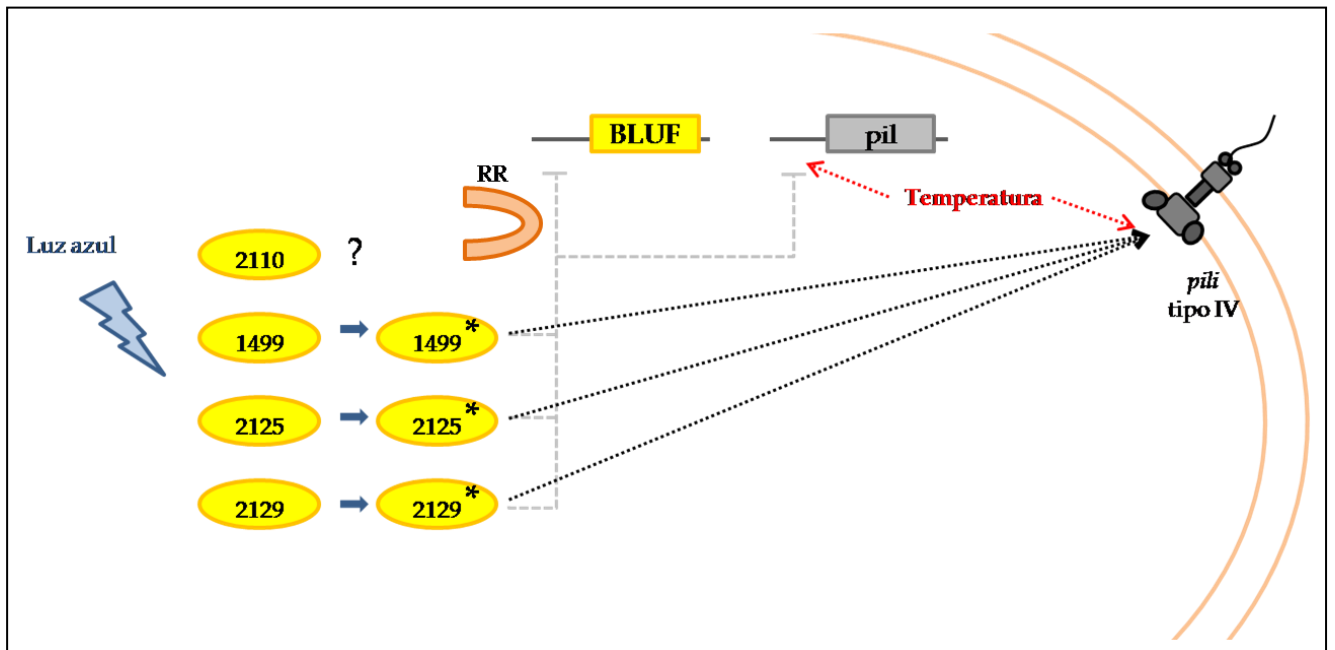
a los correspondientes a ACIAD2125 y ACIAD2129, esto sugeriría una menor actividad para la proteína codificada por ACIAD1499.



**Figura 40.** Efecto de la luz azul en la expresión de ACIAD1499 ACIAD2110, ACIAD2125 y ACIAD2129. **A.** Gel de agarosa 2,5% (p/v) muestra los productos de RT-PCR (RT) y sus correspondientes controles negativos (-) de muestras obtenidas del ensayo de motilidad tipo *twitching* de *A. baylyi* ADP1 luego de la incubación bajo luz azul (L) u oscuridad (O) a 24 °C durante 15 h. **B.** Efecto de la luz azul en los niveles de transcripción de ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129 normalizados con respecto a la expresión del control interno (*recA*). EL recuadro muestra una amplificación de los niveles de expresión de ACIAD2125 y ACIAD2129. Los resultados que se muestran corresponden a una muestra biológica que fue analizada por triplicado y los resultados se expresan como la media  $\pm$  DS. El análisis de dos muestras biológicas adicionales mostraron los mismos niveles de expresión que los aquí presentados.

Aún no es posible postular un único mecanismo molecular para la inhibición de la motilidad tipo *twitching* mediada por luz. La luz azul probablemente convierta a los dominios BLUF de su estado de oscuridad (receptor) a su estado de señalización (Figura 41). El estado de señalización de los tres dominios BLUF podrían interaccionar con un dominio efector (RR) que le permita (i) interaccionar bioquímicamente con la maquinaria del *pili* tipo IV e inhibir la motilidad tipo

*twitching* o (ii) modificar la expresión de genes que a su vez regulen este movimiento (por ejemplo, genes *pil*). Dentro de esta última posibilidad, hemos demostrado que la expresión de las proteínas BLUF se encuentra regulada por luz azul, lo que permitiría proponer la presencia de un sistema de autoregulación o regulación cruzada de los fotorreceptores y como consecuencia la limitación en sus fenotipos asociados. Sin embargo, futuros ensayos serán necesarios para analizar la vía de transducción de señales que lleva a la inhibición de la motilidad por luz azul, lo cuales permitirán distinguir entre estas dos posibilidades.



**Figura 41.** Esquema de regulación de la motilidad tipo *twitching* mediada por luz azul en *A. baylyi* ADP1. Las proteínas BLUF ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129 perciben la luz azul y se convierten al estado de señalización el cual podría interactuar con una proteína efectora (RR) y así generar una vía de señalización que culmina con la inhibición de la motilidad tipo *twitching* y la disminución de su propia expresión. La temperatura parece tener una participación en la inhibición de la motilidad. La proteína BLUF ACIAD2110 también es expresada en condiciones de luz y oscuridad, pero el mecanismo en el que se encontraría involucrada es aún desconocido.

## CONCLUSIONES

- Se demostró que la formación de biofilm en *A. baylyi* ADP1 no depende ni de la temperatura ni se modifica por el efecto de la luz, lo cual se diferencia de *A. baumannii* donde la formación de biofilm es mayor a 24°C, temperatura en la que se demostró la inhibición de esta por luz (Mussi y col., 2010).
- La producción de sideróforos de tipo catecol, la frecuencia de transformación y la motilidad tipo *twitching* resultaron inhibidos/reducidos por la incidencia de la luz. Por lo que se propone que el efecto de la luz en estos dos últimos fenotipos podría deberse a una reducida actividad del *pili* tipo IV.
- La motilidad tipo *twitching* en *A. baylyi* ADP1 está regulada por situaciones de estrés tales como la incidencia de la luz azul, bajas temperaturas y la limitación de hierro, lo cual también ha sido descrito para la motilidad en *A. baumannii* (Clemmer y col., 2011; Mussi y col., 2010).
- La construcción de mutantes noqueadas simples en genes codificantes para proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 y el estudio de la motilidad tipo *twitching* permitió evidenciar que las proteínas BLUF codificadas por los genes ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129 son activas y necesarias para la regulación de la motilidad, mientras que ACIAD2110 no participa en la regulación de este fenotipo. Esto último se confirmó al analizar la mutante noqueada en los tres genes activos (B++M3), la cual no mostró modificación de la motilidad por la luz. Sin embargo, no puede descartarse la participación de la proteína BLUF codificada por el gen ACIAD2110 en la regulación de otro fenotipo.
- El análisis de la motilidad tipo *twitching* de las cepas complementadas indicó que si bien las tres proteínas activas son necesarias para la inhibición de la motilidad por luz azul, las distintas proteínas pueden compensarse unas a otras en esta propiedad y revertir al fenotipo al de la cepa salvaje. Más aún, la complementación de la mutante noqueada triple demostró que cada una de las proteínas implicadas en la regulación de la motilidad tipo *twitching* por luz azul es suficiente para revertir el fenotipo al de la cepa salvaje, confirmando la redundancia de los respectivos genes y contribuyendo a la hipótesis que postula que los bajos niveles de expresión

de estos explicaría la necesidad de las tres proteínas para desencadenar la inhibición de la motilidad en *A. baylyi* ADP1.

- El estudio de la expresión de los cuatro genes codificantes para proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 demostró que todos los genes se expresan tanto en luz como en oscuridad.
- La cuantificación de los niveles de expresión de ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129 mostró que los mismos eran menores bajo la incidencia de luz azul. Por un lado, esto permite proponer un sistema de autorregulación o regulación cruzada de la síntesis de los fotorreceptores y por el otro, esto explica la necesidad de que los tres genes sean expresados con el fin de alcanzar la cantidad de fotorreceptor necesaria bajo condiciones de luz para provocar la inhibición de la motilidad tipo *twitching*.

## DISCUSIÓN FINAL

En los últimos años los miembros del complejo Acb han cobrado particular importancia debido a que provocan un amplio rango de infecciones intrahospitalarias. La capacidad de sobrevivir a la desecación y a la limitación de nutrientes, junto a la resistencia a antibióticos favorecen a la persistencia de *Acinetobacter* en el ambiente hospitalario. Sin embargo, otros procesos son necesarios para lograr una infección exitosa. En este trabajo nueve cepas del género *Acinetobacter* aisladas de pacientes o del ambiente hospitalario fueron analizadas en cuanto a marcadores fenotípicos posiblemente relacionados con virulencia. Si bien la mayor parte de los marcadores mostraron gran variabilidad, la producción de sideróforos de tipo catecol fue significativamente mayor en las cepas aisladas de pacientes, por lo que podría ser considerado un marcador de virulencia en *Acinetobacter*. Por otro lado, sólo los miembros del complejo Acb produjeron AHL de cadena mediana o larga y presentaron inhibición de la motilidad tipo *twitching* por luz azul, ampliando el número de marcadores que caracterizan a este complejo. Los genes implicados en el sistema de QS (*luxI* y *luxR*) fueron encontrados como copias únicas en las cepas del complejo Acb, lo cual es consistente con la presencia de secuencias únicas de dichos genes en los genomas completamente secuenciados de *Acinetobacter*. Sin embargo, algunas cepas mostraron múltiples manchas en la separación por RP-TLC correspondientes a distintas especies químicas de AHL, lo que sugiere que la AHL sintasa no es específica de sustrato. Estos resultados coinciden con lo descrito para *A. baumannii* M2, cuyo *luxI* (denominado *abaI*) codifica para *AbaI*, la única proteína del género caracterizada funcionalmente como sintasa del sistema de QS (Niu y col., 2008). Este análisis mostró la gran variabilidad del género *Acinetobacter* en cuanto a marcadores fenotípicos relacionados con virulencia, lo que explica la gran dificultad en la prevención y tratamiento de infecciones provocadas por este patógeno oportunista.

En los organismos quimiotróficos las proteínas LOV y BLUF han sido descritas como posibles responsables de las respuestas a la luz. La presencia de dominios efectores unidos covalentemente a los dominios sensores de luz azul da una sugerencia explícita del mecanismo en el dichos fotorreceptores participan. Sin embargo, este no es el caso de *Acinetobacter*, donde las cinco especies con genomas completamente secuenciados que poseen secuencias codificantes para proteínas BLUF presentan una arquitectura BLUF corta. Por otro lado, el análisis de la frecuencia en la cual se encuentran las secuencias codificantes para proteínas BLUF en el género demostró que mientras *A. baumannii* posee una única secuencia, las otras cuatro especies poseen múltiples

secuencias. Este resultado refleja otra característica variable dentro del género, como también la importancia de la conservación de dichas secuencias para la fisiología de la bacteria.

El estudio de los fenotipos asociados a la luz en *A. baylyi* ADP1 mostró que su formación de biofilm no depende ni de la temperatura ni se modifica por el efecto de la luz, lo cual se diferencia de lo descrito para *A. baumannii* a 24°C (Mussi y col., 2010). Por otro lado, se demostró que en *A. baylyi* ADP1 la luz inhibe/reduce la producción de sideróforos de tipo catecol, la frecuencia de transformación y la motilidad tipo *twitching*, siendo esta última también regulada por la temperatura y la disponibilidad de hierro, coincidiendo con lo descrito para *A. baumannii* (Mussi y col., 2010; McQueary y col., 2012). Para comprender la significancia biológica de la regulación por luz comparamos una cepa ambiental (*A. baylyi* ADP1) y una cepa patógena oportunista (*A. baumannii*): en *A. baylyi* ADP1 la regulación por luz permitiría una adaptación de su fisiología al medio ambiente en el que se encuentra, mientras que en *A. baumannii* la respuesta a la luz a temperaturas ambientales permitiría a este patógeno prepararse para su encuentro con el hospedador. Se postula que 24°C es la temperatura en las heridas y que en ese sitio al sentir la luz *A. baumannii* disminuye la motilidad, la formación de biofilm y aumenta la virulencia. Si bien estos resultados fueron obtenidos en una única cepa de *A. baumannii*, hemos demostrado la existencia de regulación de la motilidad tipo *twitching* por luz azul en cepas del complejo Acb, por lo que el futuro estudio de la regulación de la virulencia de dichas cepas permitirá ampliar el conocimiento de la implicación de la luz azul en la virulencia de *Acinetobacter*.

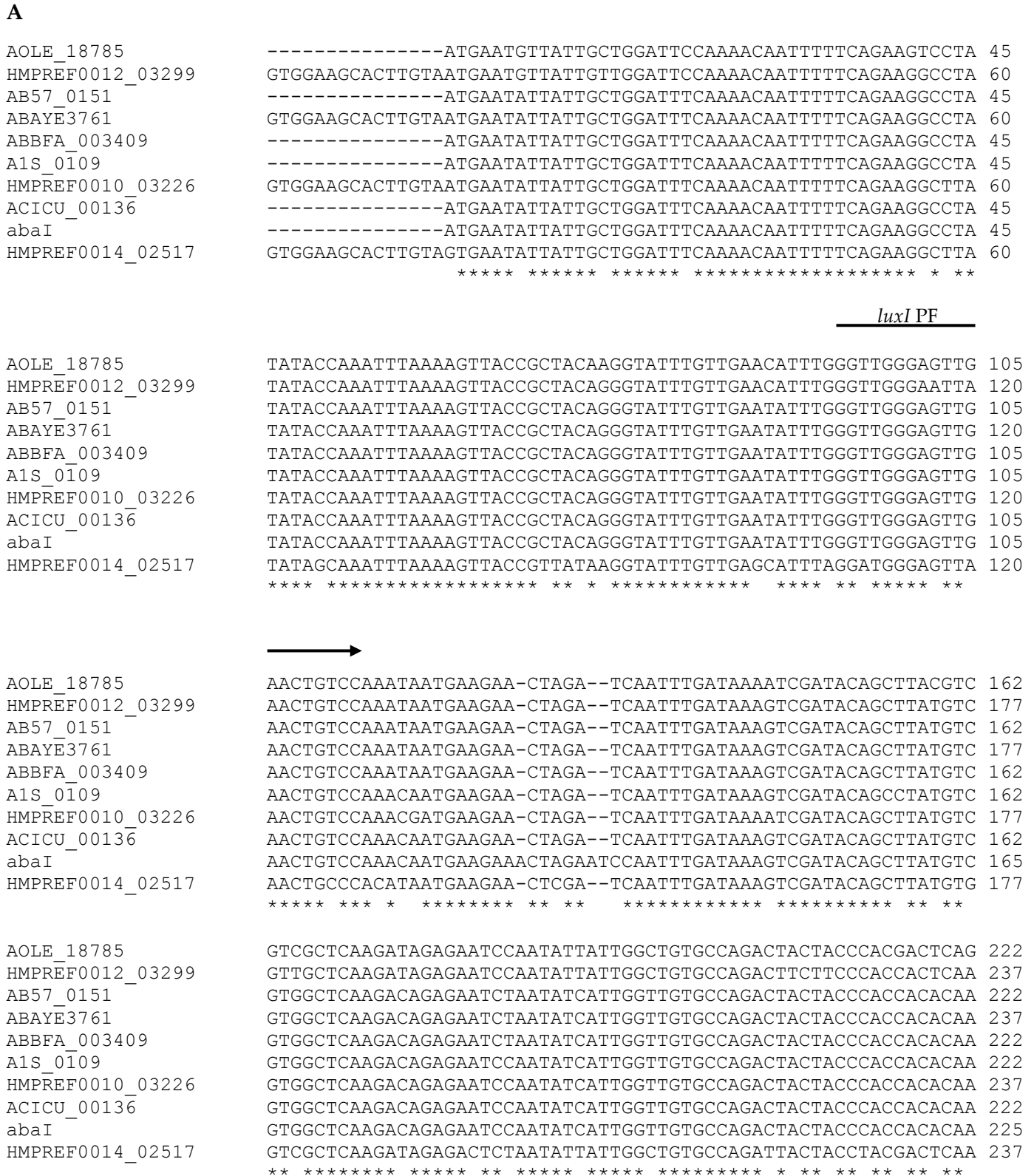
En este trabajo se demostró que las proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 codificadas por los genes ACIAD1499, ACIAD2125 y ACIAD2129 son activas y necesarias para la regulación de la motilidad y, debido a la baja expresión de dichos genes en condición de luz, los tres genes deben expresarse para alcanzar la cantidad de fotorreceptor necesaria para provocar la inhibición de la motilidad. A pesar de que la proteína codificada por ACIAD2110 es la que presenta mayor similitud a la descrita para *A. baumannii* como participante en la regulación de la motilidad, sorprendentemente en *A. baylyi* ADP1 dicha proteína no participa en la regulación de este fenotipo. Futuras investigaciones serán necesarias para poder dilucidar el mecanismo molecular para la inhibición de la motilidad tipo *twitching* mediada por luz en *A. baylyi* ADP1.

El estudio de la regulación de la motilidad tipo *twitching* mediada por proteínas BLUF en *A. baylyi* ADP1 realizado en esta tesis revela una redundancia genética poco común en bacterias y constituye el primer ejemplo de acción conjunta de tres fotorreceptores en un organismo procariota.

# **Anexo 1**

**Secuencias codificantes para LuxI y LuxR en *Acinetobacter***

**Figura 42. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas correspondientes a diez genomas de *Acinetobacter* para *luxI* (A) y a 9 genomas de *Acinetobacter* para *luxR* (B). Se muestran los locus-tags de GenBank. Los asteriscos indican el mismo residuo en todas las secuencias. Las flechas marcan las posiciones en las que los oligonucleótidos hibridan.**





AOLE\_18785 CCCTATTTACTGGGTGAAATATTTCCCTCAATTAATGAATGGAATGCCTATTCCTTGCTCA 282  
HMPREF0012\_03299 CCCTATTTACTCGGTGAAGTATTTCCCTCAATTAATGAATGGAATGCCTATTCCTTGCTCA 297  
AB57\_0151 CCTTATTTACTCGGGGAAATATTTCCCAACTTCTCAATGGAATGCCTATTCCTTGCTCA 282  
ABAYE3761 CCTTATTTACTCGGGGAAATATTTCCCAACTTCTCAATGGAATGCCTATTCCTTGCTCA 297  
ABBFA\_003409 CCTTATTTACTCGGGGAAATATTTCCCAACTTCTCAATGGAATGCCTATTCCTTGCTCA 282  
A1S\_0109 CCCTATTTACTCGGGGAAATATTTCCCAACTTCTCAATGGAATGCCTATTCCTTGCTCA 282  
HMPREF0010\_03226 CCCTATTTACTCGGGGCAATATTTCCCAACTTCTCAATGGAATGCCTATTCCTTGCTCA 297  
ACICU\_00136 CCCTATTTACTCGGGGAAATATTTCCCAACTTCTCAATGGAATGCCTATTCCTTGCTCA 282  
abaI CCCTATTTACTCGGGGAAATATTTCCCAACTTCTCAATGGAATGCCTATTCCTTGCTCA 285  
HMPREF0014\_02517 CCGTATTTACTTGGTGAATATTTCCCTCAATTACTTAATGGAATACCTCTCCCGTGTTC 297  
\*\* \*\*\*\*\* \* \* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \* \* \* \*

AOLE\_18785 CCAGAAATTTGGGAATTATCAAGATTTTCAGCCGTAGATTTCTCAAATCCGCCGACCTCT 342  
HMPREF0012\_03299 CCAGAAATTTGGGAATTATCAAGATTTTCAGCCGTAGATTTCTCGAATCCACCTTCCTCT 357  
AB57\_0151 CCAGAAATTTGGGAATTATCAAGGTTTTTCAGCCGTAGATTTTTCAAATCCGCCTTCCTCT 342  
ABAYE3761 CCAGAAATTTGGGAATTATCAAGGTTTTTCAGCCGTAGATTTTTCAAATCCGCCTTCCTCT 357  
ABBFA\_003409 CCAGAAATTTGGGAATTATCAAGGTTTTTCAGCCGTAGATTTTTCAAATCCGCCTTCCTCT 342  
A1S\_0109 CCAGAAATTTGGGAATTATCAAGGTTTTTCAGCCGTAGATTTTTCAAATCCGCCTTCCTCT 342  
HMPREF0010\_03226 CCAGAAATTTGGGAATTATCAAGGTTTTTCAGCCGTAGATTTTTCAAATCCGCCTTCCTCT 357  
ACICU\_00136 CCAGAAATTTGGGAATTATCAAGATTTTCAGCCGTAGATTTTTCAAATCCACCTTCCTCT 342  
abaI CCAGAAATTTGGGAATTATCAAGGTTTTTCAGCCGTAGATTTTTCAAACCGCCTTCCTCT 345  
HMPREF0014\_02517 CCAGAAATTTGGGAATTATCAAGATTTTCAGCCGTAGATTTTTCAAATCCGCCTACAACA 357  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \* \* \* \*

AOLE\_18785 GCTAATCAAGCAGTGTTCATCCCCAGTCTCTATTGCAATTCTGCAAGAAGCGATCAACTTT 402  
HMPREF0012\_03299 GCTAGTCAAGCAGTGTTCATCTCCTGTCTCTATTGCAATTCTGCAAGAAGCGATTAATTT 417  
AB57\_0151 GCTAGTCAAGCAGTGTTCATCACCTGTCTCAATTGCAATTCTGCAAGAAGCAATCAACTTT 402  
ABAYE3761 GCTAGTCAAGCAGTGTTCATCACCTGTCTCAATTGCAATTCTGCAAGAAGCAATCAACTTT 417  
ABBFA\_003409 GCTAGTCAAGCAGTGTTCATCACCTGTCTCAATTGCAATTCTGCAAGAAGCAATCAACTTT 402  
A1S\_0109 AGCAGTCAGGCTGTGTTCATCACCGGTCTCAATTGCAATTCTGCAAGAAGCAATCAACTTT 402  
HMPREF0010\_03226 AGCAGTCAGGCTGTGTTCATCACCGGTCTCAATTGCAATTCTGCAAGAAGCAATCAACTTT 417  
ACICU\_00136 AGCAGTCAGGCTGTGTTCATCACCGGTCTCAATTGCAATTCTGCAAGAAGCAATCAACTTT 402  
abaI AGCAGTCAGGCTGTGTTCATCACCTATCTCAATTGCAATTCTGCAAGAAGCAATTAATTT 405  
HMPREF0014\_02517 GCAAGTCAAGCAGTGTTCATCGCCAGTTCTATTGCAATTTTTCGCAAGAAGCGATTAACTTT 417  
\* \*

*luxI* PR



AOLE\_18785 GCAAGAAAAAAGGTCGCAAAACAACCTCATTACGACCTCACCTCTTGGGGTAGAGCGGTTA 462  
HMPREF0012\_03299 GCAAGAGAACAAGGCGCAAAACAACCTCATTACGACCTCACCTCTTGGGTGTAGAGCGATTA 477  
AB57\_0151 GCAAGAGAACAAGGCGCAAAACAACCTCATTACGACGTCCTCTTGGAGTAGAACGTTTA 462  
ABAYE3761 GCAAGAGAACAAGGCGCAAAACAACCTCATTACGACGTCCTCTTGGAGTAGAACGTTTA 477  
ABBFA\_003409 GCAAGAGAACAAGGCGCAAAACAACCTCATTACGACGTCCTCTTGGAGTAGAACGTTTA 462  
A1S\_0109 GCAAGAGAACAAGGCGCAAAACAACCTCATTACGACTTCTCCTCTTGGAGTAGAACGTTTA 462  
HMPREF0010\_03226 GCAAGAGAACAAGGCGCAAAACAACCTCATTACGACTTCTCCTCTTGGAGTAGAACGTTTA 477  
ACICU\_00136 GCAAGAGAACAAGGCGCAAAACAACCTCATTACGACTTCTCCTCTTGGAGTAGAACGTTTA 462  
abaI GCAAGAGAACAAGGCGCAAAACAACCTCATTACGACTTCTCCTCTTGGAGTAGAACGTTTA 465  
HMPREF0014\_02517 GCAAGAGAACAAGGGGCCAAACAACCTTATTACGACCTCTCCTCTAGGTGTAGAGCGTTTA 477  
\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

AOLE\_18785 TTACGTGCCGCGGGTTTTTCGCGCCCATCGTGCCGACCGCCAATGATTATCGATGGATAT 522  
HMPREF0012\_03299 TTACGTGCTGCGGGTTTTTCGTGCTCATCGTGCAGGTCGCAATGGTTATCGACGGATAT 537  
AB57\_0151 TTACGTGCTGCGGGTTTTTCGTGCCCATCGTGCAGGTCACCAATGACGATTGATGGATAT 522  
ABAYE3761 TTACGTGCTGCGGGTTTTTCGTGCCCATCGTGCAGGTCACCAATGACGATTGATGGATAT 537  
ABBFA\_003409 TTACGTGCTGCGGGTTTTTCGTGCCCATCGTGCAGGTCACCAATGACGATTGATGGATAT 522  
A1S\_0109 TTACGTGCTGCGGGTTTTTCGTGCCCATCGTGCAGGTCACCAATGACGATTGATGGATAT 522  
HMPREF0010\_03226 TTACGTGCTGCGGGTTTTTCGTGCCCATCGTGCAGGTCACCAATGACGATTGATGGATAT 537  
ACICU\_00136 TTACGTGCTGCGGGTTTTTCGTGCCCATCGTGCAGGTCACCAATGACGATTGATGGATAT 522  
abaI TTACGTGCTGCGGGTTTTTCGTGCCCATCGTGCAGGTCACCAATGATGATTGATGGATAT 525  
HMPREF0014\_02517 TTACGTGCTGCTGGTTTTTCGCGCCCATCGTACAGGCCACCAATGACGATTGATGGCTAT 537  
\*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \* \* \* \* \* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \* \* \*

AOLE\_18785 GCTATGTTTGCATGCTTGATTGAAGTTTAG 552  
HMPREF0012\_03299 GCTATGTTTGCATGCTTAAATTGAAGTGTAG 567  
AB57\_0151 TCGATGTTTGCATGCTTGATTGATATCTAA 552  
ABAYE3761 TCGATGTTTGCATGCTTGATTGATATCTAA 567  
ABBFA\_003409 TCGATGTTTGCATGCTTGATTGATATCTAA 552  
A1S\_0109 TCGATGTTTGCATGCTTGATTGATATCTAA 552  
HMPREF0010\_03226 TCGATGTTTGCATGCTTGATTGATATCTAA 567  
ACICU\_00136 TCGATGTTTGCATGCTTGATTGATATCTAA 552  
abaI TCGATGTTTGCATGCTTGATTGATGTGTAA 555  
HMPREF0014\_02517 TCTATGTTTGCCTGTTTAAATTGATGTGTAA 567  
\* \* \* \* \*

**B**

ABAYE3758 ATGGAAGTTGGCAAGAGGATTTATTATCAGCATT TTTGGTGGTAAAAATGAATACCAG 60  
ABBFA\_003407 ATGGAAGTTGGCAAGAGGATTTATTATCAGCATT TTTGGTGGTAAAAATGAATACCAG 60  
AB57\_0153 ATGGAAGTTGGCAAGAGGATTTATTATCAGCATT TTTGGTGGTAAAAATGAATACCAG 60  
HMPREF0010\_03224 ATGGAAGTTGGCAAGAGGATTTATTATCAGCATT TTTGGTGGTAAAAATGAATACCAG 60  
A1S\_0111 ATGGAAGTTGGCAAGAGGATTTATTATCAGCATT TTTGGTGGTAAAAATGAATACCAG 60  
ACICU\_00138 ATGGAAGTTGGCAAGAGGATTTATTATCAGCATT TTTGGTGGTAAAAATGAATACCAG 60  
HMPREF0014\_02520 ATGGAAGTTGGCAAGAGGATTTATTATCAGCATT TTTGGTGGTAAAAATGAATACCAG 60  
AOLE\_18775 ATGGAAGTTGGCAAGAGGATTTATTATCAGCATT TTTGGTGGTAAAAATGAATACCAG 60  
HMPREF0012\_03297 ATGGAAGTTGGCAAGAGGATTTATTATCAGCATT TTTGGTGGTAAAAATGAATACCAG 60  
\*\*\*\*\*

*luxR* PF

ABAYE3758 TTGTTTGGAGATCGTTAAATCTACCGCATCAAGGCTCGGATTTGACTATTGCGCTTATGGT 120  
ABBFA\_003407 TTGTTTGGAGATCGTTAAATCTACCGCATCAAGGCTCGGATTTGACTATTGCGCTTATGGT 120  
AB57\_0153 TTGTTTGGAGATCGTTAAATCTACCGCATCAAGGCTCGGATTTGACTATTGCGCTTATGGT 120  
HMPREF0010\_03224 TTGTTTGGAGATCGTTAAATCTACCGCATCAAGGCTCGGATTTGACTATTGCGCTTATGGT 120  
A1S\_0111 TTATTTGAGATCGTTAAATCTACCGCATCAAGGCTCGGATTTGACTATTGCGCTTATGGT 120  
ACICU\_00138 TTGTTTGGATTTGTTAAATCTATCGCATCAAGGCTCGGATTTGACTATTGCGCTTATGGT 120  
HMPREF0014\_02520 TTGTTTGAAGTAGTCAAATCTACAGCGTCAAAGCTTGGATTTGATTATTGTGCTTATGGT 120  
AOLE\_18775 CTATTTGAGTACGTTAAATCTACAGCGTCAAAGCTTGGATTTGATTATTGTGCTTATGGT 120  
HMPREF0012\_03297 CTATTTGAGTACGTTAAATCTACAGCGTCAAAGCTTGGATTTGATTATTGTGCTTATGGT 120  
\* \* \* \* \*

ABAYE3758 ATGCAATCACCTTATCTATTGCTGAACCAAAAACAATTATGTTGAATAATTATCCAGAA 180  
ABBFA\_003407 ATGCAATCACCTTATCTATTGCTGAACCAAAAACAATTATGTTGAATAATTATCCAGAA 180  
AB57\_0153 ATGCAATCACCTTATCTATTGCTGAACCAAAAACAATTATGTTGAATAATTATCCAGAA 180  
HMPREF0010\_03224 ATGCAATCACCTTATCTATTGCTGAACCAAAAACAATTATGTTGAATAATTATCCAGAA 180  
A1S\_0111 ATGCAATCACCTTATCTATTGCTGAACCAAAAACAATTATGTTGAATAATTATCCAGAA 180  
ACICU\_00138 ATGCAATCACCTTATCTATTGCTGAACCAAAAACAATTATGTTGAATAATTATCCAGAA 180  
HMPREF0014\_02520 ATGCAGTCACCGCTGCTATTGCTGAACCAAAAACAATTATGTTGAATAATTATCCAGAA 180  
AOLE\_18775 ATGCAGTCACCGCTGCTATTGCTGAACCAAAAACAATTATGTTGAATAATTATCCAGAA 180  
HMPREF0012\_03297 ATGCAGTCACCGCTGCTATTGCTGAACCAAAAACAATTATGTTGAATAATTATCCAGAA 180  
\*\*\*\*\*

ABAYE3758 GCATGGCAGAAACGTTATGTGGAACGGCAATATGTGAAGATAGATCCAACGTGTCAGCAT 240  
ABBFA\_003407 GCATGGCAGAAACGTTATGTGGAACGGCAATATGTGAAGATAGATCCAACGTGTCAGCAT 240  
AB57\_0153 GCATGGCAGAAACGTTATGTGGAACGGCAATATGTGAAGATAGATCCAACGTGTCAGCAT 240  
HMPREF0010\_03224 GCATGGCAGAAACGTTATGTGGAACGGCAATATGTGAAGATAGATCCAACGTGTCAGCAT 240  
A1S\_0111 GCATGGCAGAAACGTTATGTGGAACGGCAATATGTGAAGATAGATCCAACGTGTCAGCAT 240  
ACICU\_00138 GCATGGCAGAAACGTTATGTGGAACGGCAATATGTGAAGATAGATCCAACGTGTCAGCAT 240  
HMPREF0014\_02520 GCATGGCAGAAACGTTATGTGGAACGGCAATATGTGAAGATAGATCCAACGTGTCAGCAT 240  
AOLE\_18775 GCATGGCAGAAACGTTATGTGGAACGGCAATATGTGAAGATAGATCCAACGTGTCAGCAT 240  
HMPREF0012\_03297 GCATGGCAGAAACGTTATGTGGAACGGCAATATGTGAAGATAGATCCAACGTGTCAGCAT 240  
\*\*\*\*\*

ABAYE3758 TGTATGGTATCACTCCAACCTCTTGTTTGGTTCGAGTCAATCTGCAAAGACACAGGCAGAA 300  
 ABBFA\_003407 TGTATGGTATCACTCCAACCTCTTGTTTGGTTCGAGTCAATCTGCAAAGACACAGGCAGAA 300  
 AB57\_0153 TGTATGGTATCACTCCAACCTCTTGTTTGGTTCGAGTCAATCTGCAAAGACACAGGCAGAA 300  
 HMPREF0010\_03224 TGTATGGCATCACTTCAACCTCTTGTTTGGTTCGAGTCAATCTGCAAAGACACAGGCAGAA 300  
 A1S\_0111 TGTATGGTATCACTTCAACCTCTTGTTTGGTTCGAGTCAATCTGCAAAGACACAGGCAGAA 300  
 ACICU\_00138 TGTATGGTATCACTTCAACCTCTTGTTTGGTTCGAGTCAATCTGCAAAGACACAGGCAGAA 300  
 HMPREF0014\_02520 TGTATGGTATCACTTCAACCTCTTGCTGGTTCGAGTCAAAAATGCAAAAACACAAGAAGAA 300  
 AOLE\_18775 TGTATGCTATCACTTCAACCTCTTGCTGGTTCGAGCCAATCTGCAAACACACAATCTCAA 300  
 HMPREF0012\_03297 TGTATGCTGTCACCTTCAACCTCTTGCTGGTTCGAGCCAATCTGCGAACACACAATCTCAA 300  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \* \*\* \*

ABAYE3758 AAAGATTTTTGGGAGGAGGCGCGTTCTTATGGTTTTAAATGTCGGTTGGGCTCAGTCAAGC 360  
 ABBFA\_003407 AAAGATTTTTGGGAGGAGGCGCGTTCTTATGGTTTTAAATGTCGGTTGGGCTCAGTCAAGC 360  
 AB57\_0153 AAAGATTTTTGGGAGGAGGCGCGTTCTTATGGTTTTAAATGTCGGTTGGGCTCAGTCAAGC 360  
 HMPREF0010\_03224 AAAGATTTTTGGGAGGAAAGCGCGTTCTTATGGTTTTAAATGTCGGTTGGGCTCAGTCAAGC 360  
 A1S\_0111 AAAGATTTTTGGGAGGAAAGCAGTCTTATGGTTTTAAATGTCGGTTGGGCTCAGTCAAGC 360  
 ACICU\_00138 AAAGATTTTTGGGAGGAGGCGCGTTCTTATGGTTTTAAATGTCGGTTGGGCTCAGTCAAGC 360  
 HMPREF0014\_02520 AAAGATTTCTGGGAAGAGGCGCGTTCTTATGGTTTTAAATGTCGGTTGGGCTCAGTCAAGT 360  
 AOLE\_18775 AAAGATTTTTGGGAGGAGGCGCGTTCTTATGGTTTTAAACGTCGGTTGGGCACAGTCAAGC 360  
 HMPREF0012\_03297 AAAGATTTTTGGGAGGAGGCGCGTTCTTATGGTTTTAAATGTCGGTTGGGCACAATCAAGC 360  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\*

ABAYE3758 CGTGATTTTTATTGGGACCCGAGGAATGCTAACACTGGCAAGATCCAATGACCAGTTATCA 420  
 ABBFA\_003407 CGTGATTTTTATTGGGACCCGAGGAATGCTAACACTGGCAAGATCCAATGACCAGTTATCA 420  
 AB57\_0153 CGTGATTTTTATTGGGACCCGAGGAATGCTAACACTGGCAAGATCCAATGACCAGTTATCA 420  
 HMPREF0010\_03224 CGTGATTTTTATTGGGACCCGAGGAATGCTAACACTGGCAAGATCCAATGACCAGTTATCA 420  
 A1S\_0111 CGTGATTTTTATTGGGACCCGAGGAATGCTAACACTGGCAAGATCCAACGACCAGTTATCA 420  
 ACICU\_00138 CGTGATTTTTATTGGGACCCGAGGAATGCTAACACTGGCAAGATCCAACGACCAGTTATCA 420  
 HMPREF0014\_02520 CGTGATTTTTATTGGGACGAGAGGGATGTTAACACTAGCAAGATCCACCGATCAATTATCA 420  
 AOLE\_18775 CGTGACTTTTATTGGTACAAGGGGAATGCTAACACTAGCAAGATCCACTGACCAATTATTA 420  
 HMPREF0012\_03297 CGTGACTTTTATTGGTACAAGGGGAATGTTAACACTAGCAAGATCCACTGACCAATTATCT 420  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\*

ABAYE3758 GAAAAAGAGCAAAAAGCACAATATACGAATATGTACTGGTTGACTCAAACAGTGCATTCC 480  
 ABBFA\_003407 GAAAAAGAGCAAAAAGCACAATATACGAATATGTACTGGTTGACTCAAACAGTGCATTCC 480  
 AB57\_0153 GAAAAAGAGCAAAAAGCACAATATACGAATATGTACTGGTTGACTCAAACAGTGCATTCC 480  
 HMPREF0010\_03224 GAAAAAGAGCAAAAAGCACAATATACGAATATGTACTGGTTGACTCAAACAGTGCATTCC 480  
 A1S\_0111 GAAAAAGAGCAAAAAGCACAATATACGAATATGTACTGGTTAACTCAAACAGTGCATTCC 480  
 ACICU\_00138 GAAAAAGAGCAAAAAGCACAATATACGAATATGTACTGGTTAACTCAAACAGTGCATTCC 480  
 HMPREF0014\_02520 GAAAAAGAGCAAAAAGCACAATATACAAAATATGTATTGGTTGACCCAAACATTGCATTCC 480  
 AOLE\_18775 GAAAAAGAGCAGAAAAGCTCAATATACCAATATGTTTTGGCTATCTCAGACAGTACATTCC 480  
 HMPREF0012\_03297 GAAAAAGAGCAGAAAAGCTCAATATACAAAATATGTATTGGTTGTCTCAGACAGTCCATTCC 480  
 \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \* \*\* \*\* \*\*\*\*\*

ABAYE3758 AGCATTGCTAAAAATAGTAAATGATGTAGAGTTTGCTAAATTCATCTTTATTTAACGAAC 540  
 ABBFA\_003407 AGCATTGCTAAAAATAGTAAATGATGTAGAGTTTGCTAAATTCATCTTTATTTAACGAAC 540  
 AB57\_0153 AGCATTGCTAAAAATAGTAAATGATGTAGAGTTTGCTAAATTCATCTTTATTTAACGAAC 540  
 HMPREF0010\_03224 AGCATTGCTAAAAATAGTAAATGATGTAGAGTTTGCTAAATTCATCTTTATTTAACGAAC 540  
 A1S\_0111 AGCATTGCTAAAAATAGTAAATGATGTAGAGTTTGCTAAATTCATCTTTATTTAACGAAC 540  
 ACICU\_00138 AGCATTGCTAAAAATAGTAAATGATGTAGAGTTTGCTAAATTCATCTTTATTTAACGAAC 540  
 HMPREF0014\_02520 AGCATTGCTAAAAATGTCATGATGTAGAGTTTCTCAGTTCAACCTTTATTTAACGAAC 540  
 AOLE\_18775 AGTATTGCTAAAAATGTCGAATGAAACAGAATTTGCTCAGTTTAAATCTTTATTTAACGAAC 540  
 HMPREF0012\_03297 AGCATTGCTAAAAATGTCGAATGATGCAGAATTTGCTCAGTTTAAATCTTTATTTAACAAAC 540  
 \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*



>584luxI

TTTGATAAAATCGATACAGCTTATGTTCGTCGCTCAAGATAGAGAATCCAATATTATTGGCTGTGCCAGACTACTACCCAC  
GACTCAACCCTATTTACTGGGTGAAATATTTCCCTCAATTAATGAATGGAATGCCTATTCCCTTGCTCACCAGAAATTTGGG  
AATTATCAAGATTTTCAGCCGTAGATTTCTCGAATCCGCCGACCTCTGCTAATCAAGCAGTGTGCATCCCTGTCTCTATT  
GCTATTCTGCAAGAAGCGATCAACTTCGCGAGAGAACAAGG

>875luxI

TTTGATAAAGTCGATACAGCTTATGTTCGTTGGCTCAAGACAGAGAATCTAATATCATTGGTTGTGCCAGACTACTACCCAC  
CACACAACCTTATTTACTCGGGGAAATATTTCCCAACTTCTCAATGGAATGCCTATTCCCTTGCTCACCAGAAATTTGGG  
AATTATCAAGTTTTTCAGCCGTAGATTTTTCAATCCGCCCTTCTCTGCTAGTCAAGCAGTGTGCATCACCTGTCTCAATT  
GCAATTCTGCAAGAAGCAATCAACTTTGCAAGAGAACAAGG

## B

>134luxR

AACGATTATGTTGAATAATTATCCAGAAGCATGGCAGAAACGTTATGTGGAACGGCAATATGTGAAGATAGATCCAACTG  
TGCAGCATTGTATGGTATCACTTCAACCTCTTGTGGTTCGAGTCAATCTGCAAAGACACAGGCAGAAAAAGATTTTTGG  
GAGGAAGCGCGTTCTTATGGTTTTAAATGTTCGGTTGGGCTCAGTCAAGCCGTGATTTTATTGGGACCCGAGGAATGCTAAC  
ACTGGCAAGATCCAACGACCAGTTATCAGAAAAAGAGCAAAAAGCACAATATACGAATATGTACTGGTTAACTCAAACAG  
TGCATTCCAGCATTGCTAAAATAGTAAATGATGTAGAGTTTGCTAAATTCAATCTTTATTTAACGAACAGGGAAAAAGAG  
GCATTACGTTGGACTGCCGAAGGCAAAACGTCAGCAGAAATAGCTCAGATTCTTGGGGTAACTGAAAGAACCCTAAATTT  
CCATCTCAGTAATTCATGCAA

>503luxR

AAAACAATTATGTTGAATAATTATCCTCAGGCATGGCAAAAGCGCTATATAGAACAACGTTACGTGAAGGTAGACCCTAC  
TGTGCAGCATTGTATGGTATCACTTCAACCTCTTGTCTGGTTCGAGTCAAAATGCAAAAACACAAGAAGAAAAAGATTTCT  
GGGAAGAGGCGCGTTCTTATGGTTTTAAATGTTCGGTTGGGCTCAGTCAAGTCGTGATTTTATTGGGACGAGAGGGATGTTA  
ACACTAGCAAGATCCACCAGTCAATTATCAGAAAAAGAGCAAAAAGCACAATATACAAATATGTATTGGTTGACCCAAAC  
AGTGCATTCCAGCATTGCTAAAATTGTCAATGATGTAGAGTTCTCTCAGTTCAACCTTTATTTAACGAACCGAGAAAAAG  
AAGCTTTACGTTGGACAGCAGAGGGTAAAACCTCAGCAGAGATTGCTCAGATTATTGGGGTACTGAAAGAACCCTGTAAT  
TTT

>509luxR

ACCAAAAACGATTATGTTGAATAATTATCCAGAAGCATGGCAAAAGCGTTATTTGGAACAGCATTATGTGAAGGTAGATC  
CAACTGTGCAGTATTGTATGGTATCACTTCAACCTCTTGTCTGGTTCGAGCCAATCTGCAAAGACACAAGAAGAAAAAGAT  
TTCTGGGAGGAGGCGCGCTCTTATGGCCTTAATGTTCGGTTGGGCTCAGTCAAGTCGTGACTTTATTGGAACCAGAGGGAT  
GTTAACACTCGCAAGATCCAGTGACCAATTGTTCGAAAAAGAGCAAAAAGGCACAATATACAAATATGTATTGGTTGTCTC  
AGACAGTGCATTCTAGCATTGCTAAAAGTTGTAATGAGGTGGAATTCGCTCAGTTTAACTTTATTTAACGAACCGAGAA  
AAAGAGGCACTCCGTTGGACTGCTGAGGGTAAAACGTCAGCAGAAATTGCCAGATTCTAGGGGTGAC

>584luxR

TTGCTGAACCAAAAACAATTATGTTGAATAATTATCCGAAGCATGGCAGAAAGCGTTATGTTAAACAGCAATATGTGGTG  
GTAGATCCAACCGTACAGCATTGTATGCTGTCACTTCAACCTCTTGTCTGGTTCGAGTCAATCTGCGAACACACAATCTCA  
AAAAGATTTTTGGGAGGAGGCGCGTTCTTATGGTTTTAAATGTTGGTTGGGCACAGTCAAGCCGTGACTTTATTGGTACAA  
GGGGGATGTTAACGCTAGCAAGATCCGCTGACCAATTATCAGAAAAAGAGCAGAAAGCTCAATATACAAATATGTATTGG  
TTGTCTCAGACAGTGCATTCCAGCATTGCTAAAATTGTGAATGATGCAGAATTTGCTCAGTTTAACTTTATTTAACGAA  
CCGGGAAAAAGAGGTTCTACGTTGGACTGCGGAAGGAAAAACGTCAGCAGAGATAGCCAGATTCTCGGGTAACTGAAA  
GAACAGTAAATTTTCATCTCTGTAACCTCAATG

>875luxR

TTGCTGAACCAAAAACAATTATGTTGAATAATTATCCGAAGCATGGCAGAAACGTTATGTGGAACGGCAATATGTGAAG  
ATAGATCCAACCTGTGCAGCATTGTATGGTATCACTCCAACCTCTTGTGGTTCGAGTCAATCTGCAAAGACACAGGCAGA  
AAAAGATTTTTGGGAGGAGGCGCGTTCTTATGGTTTTAAATGTTCGGTTGGGCTCAGTCAAGCCGTGATTTTATTGGGACCC  
GAGGAATGCTAACACTGGCAAGATCCAATGACCAGTTATCAGAAAAAGAGCAAAAAGCACAATATACGAATATGTACTGG  
TTGACTCAAACAGTGCATTCCAGCATTGCTAAAATAGTAAATGATGTAGAGTTTGCTAAATTCAATCTTTATTTAACGAA  
CAGGGAAAAAGAGGCGCTACGTTGGACTGCGGAAGGCAAAACGTCAGCAGAAATAGCTCAGATTCTTGGAGTAACTGAAA  
GAACCGTAAATTTCCATCTCAGTAATTCATGCAA

**C**

>134LuxI  
 DTAYVVAQDRESNIIIGCARLLPTTQPYPYLLGEIFPQLLNGMPIPCSPEIWELSRFSAVDFSNPPSSSSQAVSSPVSIAILQ  
 EAINFAREQGA

>503LuxI  
 VDTAYVVAQDRDSNIIIGCARLLPTTQPYPYLLGEIFPQLMNGIPLPCSPEIWELSRFSAVDFSNPPTTASQAVSSPVSIAIL  
 QEAINLQEHKGQT

>509LuxI  
 FDKVDTAYVVAQDRESNIIIGCARLLPTTQPYPYLLGEIFPQLLNGMPIPCSPEIWELSRFSAVDFSNPPSSASQAVSSPVSI  
 AILQESINLQENKAPN

>584LuxI  
 FDKIDTAYVVAQDRESNIIIGCARLLPTTQPYPYLLGEIFPQLMNGMPIPCSPEIWELSRFSAVDFSNPPTSANQAVSSPVSI  
 AILQEAINFAREQG

>875LuxI  
 FDKVDTAYVVAQDRESNIIIGCARLLPTTQPYPYLLGEIFPQLLNGMPIPCSPEIWELSRFSA  
 VDFSNPPSSASQAVSSPVSIAILQEAINFAREQG

**D**

>134LuxR  
 TIMLNNYPEAWQKRYVERQYVKIDPTVQHCMVSLQPLVWSSQSAKTQAEKDFWEEARSYGLNVGWAQSSRDFIGTRGMLT  
 LARSNDQLSEKEQKAQYTNMYWLTQTVHSSIAKIVNDVEFAKFNLYLTNREKEALRWTAEGKTSAEIAQILGVTERTVNF  
 HLSNSMQ

>503LuxR  
 KTIMLNNYPQAWQKRYIEQRYVKVDPTVQHCMVSLQPLVWSSQNAKTQEEKDFWEEARSYGLNVGWAQSSRDFIGTRGML  
 TLARSTDQLSEKEQKAQYTNMYWLTQTVHSSIAKIVNDVEFSQFNLYLTNREKEALRWTAEGKTSAEIAQIIGVTERTVN  
 F

>509LuxR  
 PKTIMLNNYPEAWQKRYLEQHYVKVDPTVQYCMVSLQPLVWSSQSAKTQEEKDFWEEARSYGLNVGWAQSSRDFIGTRGM  
 LTLARSDSQLSEKEQKAQYTNMYWLSQTVHSSIAKVVNEVEFAQFNLYLTNREKEALRWTAEGKTSAEIAQILGVT

>584LuxR  
 AEPKTIMLNNYPEAWQKRYVKQYVVVDPTVQHCMVSLQPLVWSSQSANTQSQKDFWEEARSYGLNVGWAQSSRDFIGTR  
 GMLTLARSDQLSEKEQKAQYTNMYWLSQTVHSSIAKIVNDAEFAQFNLYLTNREKEVLRWTAEGKTSAEIAQILGVTER  
 TVNFHLCNSM

>875LuxR  
 AEPKTIMLNNYPEAWQKRYVERQYVKIDPTVQHCMVSLQPLVWSSQSAKTQAEKDFWEEARSYGLNVGWAQSSRDFIGTR  
 GMLTLARSDQLSEKEQKAQYTNMYWLTQTVHSSIAKIVNDVEFAKFNLYLTNREKEALRWTAEGKTSAEIAQILGVTER  
 TVNFHLSNSMQ

# **Anexo 2**

**Expresión heteróloga de proteínas BLUF de  
*A. baylyi* ADP1**

Con el objeto de estudiar las cuatro proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 en cuanto a su actividad fotosensora, fotociclo y estructura como se ha realizado en otras proteínas BLUF (Laan y col., 2003; Gauden y col., 2005; Jung y col., 2005; Laan y col., 2006; Mussi y col., 2010) se siguieron las estrategias de clonado y expresión heteróloga en *E. coli* según lo descrito previamente por Laan (Laan y col., 2003).

### 1. Construcción de plásmidos para la expresión de proteínas BLUF

Los cuatro genes codificantes para proteínas BLUF (ACIAD1499, ACIAD2110, ACIAD2125 y ACIAD2129) fueron amplificados a partir de ADN genómico de *A. baylyi* ADP1 utilizando los oligonucleótidos 1499PF/1499PR, 2110PF/2110PR, 2125PF/2125PR, 2129PF/2129PR (Tabla 13). Los productos de PCR fueron clonados en plásmidos pQE30 (Qiagen) y pMAL-c4E (BioLabs), obteniéndose para el primero los plásmidos pAMB2, pAMB3, pAMB4 y pAMB5, respectivamente y para el segundo los plásmidos pAMM1, pAMM2, pAMM3 y pAMM4, respectivamente. Para el clonado se utilizó la cepa *E. coli* XL-1 blue (Qiagen) y para la expresión heteróloga la cepa *E. coli* M15 [pREP4] (Qiagen).

**Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados en el anexo 2**

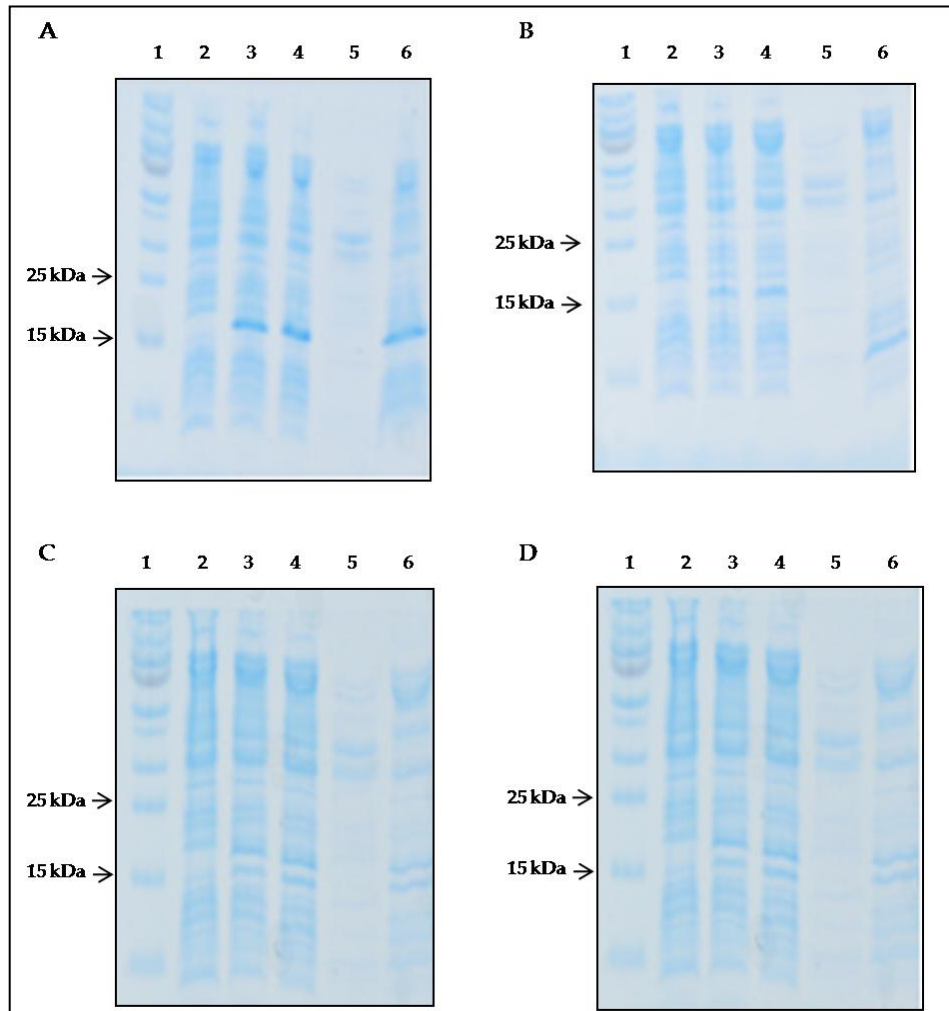
| Oligonucleótidos | Secuencia nucleotídica                           |
|------------------|--|
| 1499PF           | 5'-GCATGGATCCGATGACGATGACAAAATGGCCTATGTTAGA-3'   |
| 1499PR           | 5'-GCATCTGCAGTCAGGATGAATGAGGGTAAGGGTCA-3'        |
| 2110PF           | 5'-GCATGGATCCGATGACGATGACAAAGTGCACATACGTTT-3'    |
| 2110PR           | 5'-GCATCTGCAGCTATAAGAATGGATTAATTCCTCTG-3'        |
| 2125PF           | 5'-GCATGGATCCGATGACGATGACAAAATGTATGCAAGTAAGAC-3' |
| 2125PR           | 5'-GCATCTGCAGCTAATGCATATCAGCTTGCTGAT-3'          |
| 2129PF           | 5'-GCATGGATCCGATGACGATGACAAATTGTATTGTTTAAT-3'    |
| 2129PR           | 5'-GCATCTGCAGTTAAACATTATTTGGTTTAAGCG-3'          |

### 2. Expresión de proteínas BLUF en *E. coli* M15 (pAMB2, pAMB3, pAMB4 o pAMB5)

Las cuatro proteínas BLUF fueron expresadas según ha sido previamente descrito (Laan y col., 2003) realizando una inducción con una concentración final de IPTG de 0.2mM y crecimiento a 37°C. Se tomaron muestras de 1 ml antes de la inducción (t0), a la hora (t1) y tres horas (t3) posteriores a la inducción, con el fin de determinar la solubilidad de las proteínas se trataron con el reactivo B-PER (Thermo Scientific) según las indicaciones del fabricante, y se analizaron por SDS-PAGE (Figura 44). Los geles mostraron una banda del peso molecular esperado (~ 17 kDa) a t1 y t3,



que estaba ausente a t<sub>0</sub>; lo que indicó la expresión de las cuatro proteínas BLUF. Sin embargo, el análisis de la solubilidad reveló que las proteínas se encontraban en la fracción insoluble, indicando su expresión en cuerpos de inclusión.



**Figura 44.** Geles de SDS-PAGE 20% de proteínas totales de *E. coli* M15 conteniendo pAMB2 (A), pAMB3 (B), pAMB4 (C) o pAMB5 (D). Calle 1: marcador de peso molecular. Calles 2 a 4: proteínas totales de *E. coli* M15 conteniendo pAMB2 (A), pAMB3 (B), pAMB4 (C) o pAMB5 (D) a t<sub>0</sub>, t<sub>1</sub> y t<sub>3</sub>, respectivamente. Calle 5: proteínas presentes en los sobrenadantes luego del tratamiento con el reactivo B-PER (soluble). Calle 6: proteínas presentes en el pellet luego del tratamiento con el reactivo B-PER (insoluble).

Debido a la falta de solubilidad de las proteínas, se evaluó una nueva condición de expresión a menor temperatura a fin de favorecer el correcto plegamiento de las proteínas. Se realizó la inducción con 0,2 mM de IPTG y se crecieron los cultivos a 25°C durante 16 h. Al realizar el análisis por medio de SDS-PAGE, las proteínas se encontraron en la fracción insoluble. Por lo tanto, se realizó la solubilización de los cuerpos de inclusión utilizando un buffer conteniendo urea

8M y se purificaron las proteínas con columnas de níquel 5 ml (Handee™ centrifuge column; Pierce) en condiciones desnaturizantes y la elución de las proteínas se realizó un buffer conteniendo 500 mM imidazol a pH 8. Como las proteínas se encontraban desnaturizadas, se realizó la reconstitución de las mismas siguiendo el protocolo previamente descrito (Laan y col., 2004) Finalmente, las proteínas purificadas fueron analizadas mediante su espectro de absorción en el espectrofotómetro Hewlett-Packard 8453 UV-VIS. Si bien las cuatro proteínas mostraron la absorción correspondiente a las proteínas (280 nm), ninguna mostró los picos característicos de la flavina oxidada, 377 nm, 445 nm y 475 nm (Massuda y Bauer, 2002). Esto demostró que si bien las proteínas BLUF se habían logrado solubilizar, estas no habían incorporado el cofactor durante el plegamiento, lo que conllevó a una carencia de actividad fotorreceptora de las mismas

Con el objetivo de lograr la expresión de proteínas solubles se llevaron a cabo experimentos utilizando concentraciones de inductor más bajas y/o menores temperaturas de crecimiento. La Tabla 14 muestra las condiciones ensayadas, dentro de las cuales se encuentra las condiciones utilizadas para la expresión de BlsA de *A. baumannii*, concentración final de IPTG 0,5 mM y crecimiento a 15 °C (Mussi y col., 2010). La disminución de la concentración final de IPTG y/o el crecimiento a menores temperaturas generó ausencia de expresión proteica o bien, su expresión en cuerpos de inclusión.

**Tabla 14. Condiciones y resultados de la expresión de proteínas BLUF en *E. coli* M15**

| Temperatura | [IPTG]*  | <i>E.coli</i> M15<br>(pAMB2) | <i>E.coli</i> M15<br>(pAMB3) | <i>E.coli</i> M15<br>(pAMB4) | <i>E.coli</i> M15<br>(pAMB5) |
|-------------|----------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 37 °C       | 0.2 mM   | Si / insoluble               | Si / insoluble               | Si / insoluble               | Si / insoluble               |
|             | 40 µM    | Si / insoluble               | Si / insoluble               | Si / insoluble               | Si / insoluble               |
|             | 20 µM    | Si / insoluble               | No                           | No                           | No                           |
| 25 °C       | 0,2 mM   | Si / insoluble               | Si / insoluble               | Si / insoluble               | Si / insoluble               |
|             | 40 µM    | Si / insoluble               | No                           | No                           | No                           |
|             | 20 µM    | No                           | No                           | No                           | No                           |
| 17 °C       | 50 µM    | Si / insoluble               | Si / insoluble               | No                           | No                           |
| 15 °C ‡     | 0,5 mM ‡ | Si / insoluble               | Si / insoluble               | No                           | No                           |

\*[IPTG]: concentración final de IPTG. ‡ Condiciones ensayadas para la expresión de BlsA de *A. baumannii* (Mussi y col., 2010)

### 3. Expresión de proteínas BLUF en *E. coli* M15 (pAMM1, pAMM2, pAMM3 o pAMM4)

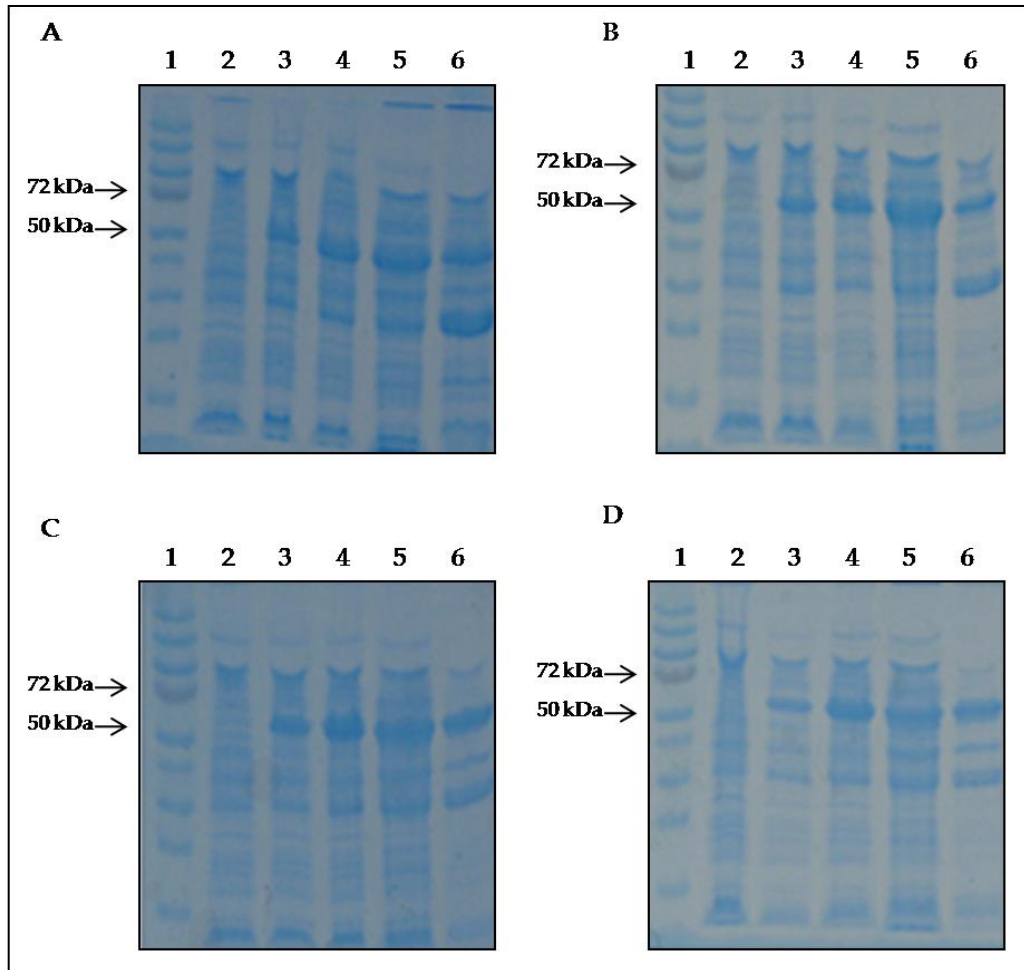
Con el fin lograr la expresión de las proteínas conteniendo BLUF en la fracción soluble se utilizó el vector pMAL-c4E, ya que posee un gen (*malE*) que codifica para una proteína de unión a maltosa (MBP) que aumenta la solubilidad de la proteína a la cual se encuentra unida (Kapust y col., 1999). Se realizaron tres experimentos en pequeña escala utilizando 250 ml de cultivo siguiendo el protocolo descrito previamente (Laan y col., 2003) Las cepas de *E. coli* M15 [pREP4] conteniendo pAMM1, pAMM2, pAMM3 o pAMM4 fueron inducidas y crecidas en las condiciones que se muestran en la Tabla 15.

**Tabla 15. Condiciones de la expresión de proteínas BLUF en *E. coli* M15 (pAMM1, pAMM2, pAMM3 o pAMM4)**

| Experimento | Temperatura | [IPTG]* |
|-------------|-------------|---------|
| A           | 30 °C       | 0,3 mM  |
| B           | 30 °C       | 30 µM   |
| C           | 25 °C       | 0,3 mM  |

\*[IPTG]: concentración final de IPTG

En todos los casos las cepas fueron crecidas hasta  $DO_{600} \sim 0,6$  y se tomaron muestras de 1 ml antes de la inducción ( $t_0$ ) y a las tres ( $t_3$ ) y seis ( $t_6$ ) horas luego de la inducción. El resto de los cultivos se dejaron crecer durante 16 h y luego fueron sonicados según el protocolo previamente descrito (Laan y col., 2003). Las muestras tomadas a distintos tiempos fueron tratadas con el reactivo B-PER (Thermo Scientific) según las indicaciones del fabricante y se corrieron en geles de SDS-PAGE 12% (Figura 45). Considerando que MBP y los dominios BLUF tienen un peso molecular de ~51kDa y ~17kDa, respectivamente, las bandas obtenidas del análisis por SDS-PAGE mostraron el peso molecular esperado, ente las bandas de 55 kDa y 72 kDa de marcador de peso molecular.



**Figura 45.** Geles de SDS-PAGE 12% de proteínas totales de *E. coli* M15 conteniendo pAMM1 (A), pAMM2 (B), pAMM3 (C) o pAMM4 (D) cuando fueron inducidas con 0,3 mM de IPTG y crecidas a 25 °C. Calle 1: marcador de peso molecular. Calles 2 a 4: proteínas totales de *E. coli* M15 conteniendo pAMM1 (A), pAMM2 (B), pAMM3 (C) o pAMM4 (D) a t0, t3 y t6, respectivamente. Calle 5: proteínas presentes en los sobrenadantes luego del tratamiento con el reactivo B-PER (soluble). Calle 6: proteínas presentes en el pellet luego del tratamiento con el reactivo B-PER (insoluble).

Los geles de SDS-PAGE mostraron que las cuatro proteínas conteniendo BLUF se expresaban en los tres experimentos ensayados. Si bien en la Figura 45 se muestran los geles obtenidos para el experimento C, los mismos resultados se obtuvieron para los experimentos A y B. Con este sistema de expresión se logró obtener proteínas en la fracción soluble. Las muestras obtenidas de los cultivos crecidos durante 16 h fueron analizadas por SDS PAGE y mostraron que parte de las proteínas estaban en la fracción soluble. Estas proteínas fueron evaluadas en cuanto a su espectro de absorción. Todas mostraron absorción a 280 nm (proteína), pero ninguna mostró la absorción típica de la flavina (picos a 377 nm, 445 nm y 475 nm). Para favorecer la unión al cofactor a las proteínas conteniendo BLUF, se realizó la reconstitución de las mismas mediante el agregado de

~30 veces de exceso molar de FAD a la fracción soluble, incubación en hielo durante 1 h y posterior diálisis contra el buffer A (20mM Tris-HCl, 200mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7,4). Luego, se midió el espectro de absorción de las muestras con el fin de evaluar la unión de FAD a la proteína. Si bien estas muestras presentaron tanto la absorción a 280 nm como los picos esperados de absorción de la flavina, en ninguno de los casos el espectro mostró el típico corrimiento de ~ 10 nm hacia el rojo cuando se lo iluminó con luz LED azul. Estos resultados indicaron que la absorción de la flavina se debía a la flavina libre presente en las muestras y las proteínas al no unirse con su cofactor no poseían actividad biológica.

#### **4. Conclusiones**

Las cuatro proteínas BLUF de *A. baylyi* ADP1 fueron clonadas en pQE30 y *E. coli* M15 fue capaz de expresarlas, aunque las proteínas se encontraban en la fracción insoluble. Se utilizaron distintas estrategias a fin de resolver esta dificultad, como la purificación de los cuerpos de inclusión y la búsqueda de condiciones óptimas de expresión, pero no fue posible expresar las proteínas en la fracción soluble con este sistema. Por lo tanto, se construyó un nuevo sistema de expresión utilizando al vector pMAL-c4E, el cual posee un gen (*malE*) que permitirá expresar una MBP en el extremo N-terminal de la proteína de fusión y fue elegido por su notable capacidad para aumentar la solubilidad de la proteína fusionada. Con este sistema *E. coli* M15 fue capaz de expresar parte de las proteínas BLUF en la fracción soluble. Sin embargo, las proteínas no tenían unido su cromóforo (FAD) y por lo tanto carecían de actividad biológica. A pesar de reconstituir las proteínas con FAD, estas no unieron al cromóforo. Una hipótesis que explicaría la falta de unión de la flavina por las proteínas BLUF sería que al ser MBP una proteína de gran tamaño molecular (~51 kDa) y encontrarse en el extremo N-terminal de la proteína de fusión, una vez sintetizada la proteínas MBP esta afectaría el correcto plegamiento del dominio BLUF y por lo tanto su capacidad de unirse a FAD y ser funcionalmente activa.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-El-Haleem, D. (2003).** *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. *Afr J Biotechnol* **2**, 71-74.
- Actis, L. A., Tolmasky, M. E., Crosa, L. M. & Crosa, J. H. (1993).** Effect of iron-limiting conditions on growth of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* **31**, 2812-2815.
- Ahmad, M. & Cashmore, A. R. (1996).** Seeing blue: the discovery of cryptochrome. *Plant Mol Biol* **30**, 851-861.
- Allende, J. L., Gibello, A., Fortun, A., Mengs, G., Ferrer, E. & Martin, M. (2000).** 4-Hydroxybenzoate uptake in an isolated soil *Acinetobacter* sp. *Curr Microbiol* **40**, 34-39.
- Anandham, R., Weon, H. Y., Kim, S. J., Kim, Y. S., Kim, B. Y. & Kwon, S. W. (2010).** *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. *J Microbiol* **48**, 36-39.
- Anderson, S., Dragnea, V., Masuda, S., Ybe, J., Moffat, K. & Bauer, C. (2005).** Structure of a novel photoreceptor, the BLUF domain of AppA from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* **44**, 7998-8005.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003).** Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215-237.
- Anstey, N. M., Currie, B. J., Hassell, M., Palmer, D., Dwyer, B. & Seifert, H. (2002).** Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *J Clin Microbiol* **40**, 685-686.
- Antunes, L. C., Imperi, F., Carattoli, A. & Visca, P. (2011).** Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS One* **6**, e22674.
- Arnow, L. E. (1937).** Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalaninetyrosine mixtures. *J Biol Chem* **118**, 531-537.
- Averhoff, B. & Graf, I. (2008).** The Natural Transformation System of *Acinetobacter baylyi* ADP1: A Unique DNA Transport Machinery in *Acinetobacter* Molecular Biology pp. 120-139. Edited by G. Ulrike Gerischer University of Ulm.
- Ávila-Pérez, M., Hellingwerf, K. J. & Kort, R. (2006).** Blue light activates the sigmaB-dependent stress response of *Bacillus subtilis* via YtvA. *J Bacteriol* **188**, 6411-6414.
- Ballario, P., Vittorioso, P., Magrelli, A., Talora, C., Cabibbo, A. & Macino, G. (1996).** White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. *EMBO J* **15**, 1650-1657.
- Barbe, V., Vallenet, D., Fonknechten, N., Kreimeyer, A., Oztas, S., Labarre, L., Cruveiller, S., Robert, C., Duprat, S. & other authors (2004).** Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res* **32**, 5766-5779.
- Barends, T. R., Hartmann, E., Griese, J. J., Beitlich, T., Kirienko, N. V., Ryjenkov, D. A., Reinstein, J., Shoeman, R. L., Gomelsky, M. & other authors (2009).** Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature* **459**, 1015-1018.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. & Turck, M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Tech Bull Regist Med Technol* **36**, 49-52.
- Baumann, P. (1968).** Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. *J Bacteriol* **96**, 39-42.
- Beatson, S. A., Whitchurch, C. B., Semmler, A. B. & Mattick, J. S. (2002).** Quorum sensing is not required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **184**, 3598-3604.
- Beja, O., Aravind, L., Koonin, E. V., Suzuki, M. T., Hadd, A., Nguyen, L. P., Jovanovich, S. B., Gates, C. M., Feldman, R. A. & other authors (2000).** Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* **289**, 1902-1906.

- Bergogne-Berezin, E. & Towner, K. J. (1996).** *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* **9**, 148-165.
- Bhaya, D., Takahashi, A. & Grossman, A. R. (2001).** Light regulation of type IV pilus-dependent motility by chemosensor-like elements in *Synechocystis* PCC6803. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7540-7545.
- Bieszke, J. A., Spudich, E. N., Scott, K. L., Borkovich, K. A. & Spudich, J. L. (1999).** A eukaryotic protein, NOP-1, binds retinal to form an archaeal rhodopsin-like photochemically reactive pigment. *Biochemistry* **38**, 14138-14145.
- Blot, S., Vandewoude, K. & Colardyn, F. (2003).** Nosocomial bacteremia involving *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients: a matched cohort study. *Intensive Care Med* **29**, 471-475.
- Bonomi, H. R., Posadas, D. M., Paris, G., Carrica Mdel, C., Frederickson, M., Pietrasanta, L. I., Bogomolni, R. A., Zorreguieta, A. & Goldbaum, F. A. (2012).** Light regulates attachment, exopolysaccharide production, and nodulation in *Rhizobium leguminosarum* through a LOV-histidine kinase photoreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 12135-12140.
- Bonomo, R. A. & Szabo, D. (2006).** Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* **43 Suppl 2**, S49-56.
- Boswell, C. D., Dick, R. E. & Macaskie, L. E. (1999).** The effect of heavy metals and other environmental conditions on the anaerobic phosphate metabolism of *Acinetobacter johnsonii*. *Microbiology* **145 ( Pt 7)**, 1711-1720.
- Bouvet, P. J. & Jeanjean, S. (1989).** Delineation of new proteolytic genomic species in the genus *Acinetobacter*. *Res Microbiol* **140**, 291-299.
- Bouvet, P. J. M. & Grimont, P. A. D. (1986).** Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol* **36** 228-240.
- Braatsch, S., Gomelsky, M., Kuphal, S. & Klug, G. (2002).** A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **45**, 827-836.
- Bradley, D. E. (1980).** A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can J Microbiol* **26**, 146-154.
- Briganti, F., Pessione, E., Giunta, C. & Scozzafava, A. (1997).** Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter* radioresistens. *FEBS Lett* **416**, 61-64.
- Brisou, J. & Prevot, A. R. (1954).** Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **86**, 722-728.
- Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V. A., Todo, T. & other authors (2003).** Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Mol Cell* **11**, 59-67.
- Bryl, K. (2003).** Visual and archaeal rhodopsins: similarities, differences and controversy. *Cell Mol Biol Lett* **8**, 285-296.
- Burton, B. & Dubnau, D. (2010).** Membrane-associated DNA transport machines. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000406.
- Busch, S., Rosenplanter, C. & Averhoff, B. (1999).** Identification and characterization of ComE and ComF, two novel pilin-like competence factors involved in natural transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4568-4574.

- Butler, W. L., Norris, K. H., Siegelman, H. W. & Hendricks, S. B. (1959).** Detection, Assay, and Preliminary Purification of the Pigment Controlling Photoresponsive Development of Plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**, 1703-1708.
- Cao, Z., Buttani, V., Losi, A. & Gartner, W. (2008).** A blue light inducible two-component signal transduction system in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Biophys J* **94**, 897-905.
- Carr, E. L., Kampfner, P., Patel, B. K., Gurtler, V. & Seviour, R. J. (2003).** Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 953-963.
- Cashmore, A. R. (2003).** Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell* **114**, 537-543.
- CDC (2004).** *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, 2002-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **53**, 1063-1066.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D. & Farrand, S. K. (1998).** Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 1119-1129.
- Choi, C. H., Lee, E. Y., Lee, Y. C., Park, T. I., Kim, H. J., Hyun, S. H., Kim, S. A., Lee, S. K. & Lee, J. C. (2005).** Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol* **7**, 1127-1138.
- Choi, C. H., Lee, J. S., Lee, Y. C., Park, T. I. & Lee, J. C. (2008).** *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol* **8**, 216.
- Christie, J. M., Swartz, T. E., Bogomolni, R. A. & Briggs, W. R. (2002).** Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *Plant J* **32**, 205-219.
- Clemmer, K. M., Bonomo, R. A. & Rather, P. N. (2011).** Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology* **157**, 2534-2544.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.
- Cusanovich, M. A. & Meyer, T. E. (2003).** Photoactive yellow protein: a prototypic PAS domain sensory protein and development of a common signaling mechanism. *Biochemistry* **42**, 4759-4770.
- Darwin, C. R. & Darwin, F. (1880).** *The power of movement in plants*. London: John Murray.
- Davis, S. J., Vener, A. V. & Vierstra, R. D. (1999).** Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* **286**, 2517-2520.
- de Berardinis, V., Vallenet, D., Castelli, V., Besnard, M., Pinet, A., Cruaud, C., Samair, S., Lechaplais, C., Gyapay, G. & other authors (2008).** A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Mol Syst Biol* **4**, 174.
- de Breij, A., Dijkshoorn, L., Lagendijk, E., van der Meer, J., Koster, A., Bloemberg, G., Wolterbeek, R., van den Broek, P. & Nibbering, P. (2010).** Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? *PLoS One* **5**, e10732.
- Delneri, D., Degrassi, G., Rizzo, R. & Bruschi, C. V. (1995).** Degradation of trans-ferulic and p-coumaric acid by *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 586. *Biochim Biophys Acta* **1244**, 363-367.
- Dijkshoorn, L., Nemec, A. & Seifert, H. (2007).** An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* **5**, 939-951.
- Dische, Z. & Shettles, L. B. (1948).** A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J Biol Chem* **175**, 595-603.
- Domratcheva, T., Grigorenko, B. L., Schlichting, I. & Nemukhin, A. V. (2008).** Molecular models predict light-induced glutamine tautomerization in BLUF photoreceptors. *Biophys J* **94**, 3872-3879.



- Dorsey, C. W., Tomaras, A. P., Connerly, P. L., Tolmasky, M. E., Crosa, J. H. & Actis, L. A. (2004). The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology* **150**, 3657-3667.
- Dragnea, V., Arunkumar, A. I., Lee, C. W., Giedroc, D. P. & Bauer, C. E. (2010). A Q63E *Rhodobacter sphaeroides* AppA BLUF domain mutant is locked in a pseudo-light-excited signaling state. *Biochemistry* **49**, 10682-10690.
- Eberhard, A., Burlingame, A. L., Eberhard, C., Kenyon, G. L., Neilson, K. H. & Oppenheimer, N. J. (1981). Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**, 2444-2449.
- Eijkelkamp, B. A., Hassan, K. A., Paulsen, I. T. & Brown, M. H. (2011). Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics* **12**, 126.
- Elbahloul, Y. & Steinbuchel, A. (2010). Pilot-scale production of fatty acid ethyl esters by an engineered *Escherichia coli* strain harboring the p(Microdiesel) plasmid. *Appl Environ Microbiol* **76**, 4560-4565.
- Elias-Arnanz, M., Padmanabhan, S. & Murillo, F. J. (2011). Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Curr Opin Microbiol* **14**, 128-135.
- Emery, P., So, W. V., Kaneko, M., Hall, J. C. & Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* **95**, 669-679.
- Engbrecht, J. & Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 4154-4158.
- Falagas, M. E. & Rafailidis, P. I. (2007). Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Crit Care* **11**, 134.
- Farrand, S. K., Qin, Y. & Oger, P. (2002). Quorum-sensing system of *Agrobacterium* plasmids: analysis and utility. *Methods Enzymol* **358**, 452-484.
- Friedberg, D. (1977). Effect of light on *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol* **131**, 399-404.
- Froehlich, A. C., Noh, B., Vierstra, R. D., Loros, J. & Dunlap, J. C. (2005). Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **4**, 2140-2152.
- Fronzes, R., Remaut, H. & Waksman, G. (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J* **27**, 2271-2280.
- Fuhs, G. W. & Chen, M. (1975). Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microb Ecol* **2**, 119-138.
- Fuqua, C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1996). Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**, 727-751.
- Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**, 269-275.
- Furukawa, K., Tomizuka, N. & Kamibayashi, A. (1979). Effect of chlorine substitution on the bacterial metabolism of various polychlorinated biphenyls. *Appl Environ Microbiol* **38**, 301-310.
- Gaddy, J. A. & Actis, L. A. (2009). Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol* **4**, 273-278.
- Gaddy, J. A., Tomaras, A. P. & Actis, L. A. (2009). The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun* **77**, 3150-3160.
- Galland, P. & Tolle, N. (2003). Light-induced fluorescence changes in *Phycomyces*: evidence for blue light-receptor associated flavo-semiquinones. *Planta* **217**, 971-982.

- Gauden, M., Grinstead, J. S., Laan, W., van Stokkum, I. H., Avila-Perez, M., Toh, K. C., Boelens, R., Kaptein, R., van Grondelle, R. & other authors (2007). On the role of aromatic side chains in the photoactivation of BLUF domains. *Biochemistry* **46**, 7405-7415.
- Gauden, M., van Stokkum, I. H., Key, J. M., Luhrs, D., van Grondelle, R., Hegemann, P. & Kennis, J. T. (2006). Hydrogen-bond switching through a radical pair mechanism in a flavin-binding photoreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10895-10900.
- Gauden, M., Yeremenko, S., Laan, W., van Stokkum, I. H., Ihalainen, J. A., van Grondelle, R., Hellingwerf, K. J. & Kennis, J. T. (2005). Photocycle of the flavin-binding photoreceptor AppA, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes. *Biochemistry* **44**, 3653-3662.
- Gautam, K. K. & Tyagi, V. K. (2006). Microbial Surfactants: A Review. *J Oleo Science* **55**, 155-166.
- Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I. & Ursing, J. (1991). Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* **29**, 277-282.
- Giraud, E., Zappa, S., Jaubert, M., Hannibal, L., Fardoux, J., Adriano, J. M., Bouyer, P., Genty, B., Pignol, D. & other authors (2004). Bacteriophytochrome and regulation of the synthesis of the photosynthetic apparatus in *Rhodospseudomonas palustris*: pitfalls of using laboratory strains. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 587-591.
- Glessner, A., Smith, R. S., Iglewski, B. H. & Robinson, J. B. (1999). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of twitching motility. *J Bacteriol* **181**, 1623-1629.
- Gohl, O., Friedrich, A., Hoppert, M. & Averhoff, B. (2006). The thin pili of *Acinetobacter* sp. strain BD413 mediate adhesion to biotic and abiotic surfaces. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1394-1401.
- Gomelsky, M. & Hoff, W. D. (2011). Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends Microbiol* **19**, 441-448.
- Gomelsky, M. & Kaplan, S. (1998). AppA, a redox regulator of photosystem formation in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, is a flavoprotein. Identification of a novel fad binding domain. *J Biol Chem* **273**, 35319-35325.
- Gomelsky, M. & Klug, G. (2002). BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci* **27**, 497-500.
- Gomez, M. J. & Neyfakh, A. A. (2006). Genes involved in intrinsic antibiotic resistance of *Acinetobacter baylyi*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3562-3567.
- González, J. E. & Keshavan, N. D. (2006). Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 859-875.
- González, R. H., Dijkshoorn, L., Van den Barselaar, M. & Nudel, C. (2009). Quorum sensing signal profile of *Acinetobacter* strains from nosocomial and environmental sources. *Rev Argent Microbiol* **41**, 73-78.
- Gray, K. M. & Garey, J. R. (2001). The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* **147**, 2379-2387.
- Griffin, E. A., Jr., Staknis, D. & Weitz, C. J. (1999). Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* **286**, 768-771.
- Henrichsen, J. & Blom, J. (1975). Correlation between twitching motility and possession of polar fimbriae in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acta Pathol Microbiol Scand B* **83**, 103-115.
- Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36**, 478-503.
- Herzberg, C., Friedrich, A. & Averhoff, B. (2000). comB, a novel competence gene required for natural transformation of *Acinetobacter* sp. BD413: identification, characterization, and analysis of growth-phase-dependent regulation. *Arch Microbiol* **173**, 220-228.
- Heyers, D., Manns, M., Luksch, H., Gunturkun, O. & Mouritsen, H. (2007). A visual pathway links brain structures active during magnetic compass orientation in migratory birds. *PLoS One* **2**, e937.

- Hoff, W. D., van der Horst, M. A., Nudel, C. B. & Hellingwerf, K. J. (2009). Prokaryotic phototaxis. *Methods Mol Biol* **571**, 25-49.
- Houang, E. T., Chu, Y. W., Leung, C. M., Chu, K. Y., Berlau, J., Ng, K. C. & Cheng, A. F. (2001). Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *J Clin Microbiol* **39**, 228-234.
- Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I. S., Larsen, E. & Briggs, W. R. (1997). *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**, 2120-2123.
- Huang, B., Whitchurch, C. B. & Mattick, J. S. (2003). FimX, a multidomain protein connecting environmental signals to twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**, 7068-7076.
- Hunger, M., Schmucker, R., Kishan, V. & Hillen, W. (1990). Analysis and nucleotide sequence of an origin of DNA replication in *Acinetobacter calcoaceticus* and its use for *Escherichia coli* shuttle plasmids. *Gene* **87**, 45-51.
- Hunter, S., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bairoch, A., Bateman, A., Binns, D., Bork, P., Das, U., Daugherty, L. & other authors (2009). InterPro: the integrative protein signature database. *Nucleic Acids Res* **37**, D211-215.
- Ingmer, H. & Brondsted, L. (2009). Proteases in bacterial pathogenesis. *Res Microbiol* **160**, 704-710.
- Iseki, M., Matsunaga, S., Murakami, A., Ohno, K., Shiga, K., Yoshida, K., Sugai, M., Takahashi, T., Hori, T. & other authors (2002). A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in *Euglena gracilis*. *Nature* **415**, 1047-1051.
- Jaeger, K. E. & Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 390-397.
- Jaeger, K. E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., van Heuvel, M. & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev* **15**, 29-63.
- Jangid, K., Kong, R., Patole, M. S. & Shouche, Y. S. (2007). *luxRI* homologs are universally present in the genus *Aeromonas*. *BMC Microbiol* **7**, 93.
- Janssen, P., Maquelin, K., Coopman, R., Tjernberg, I., Bouvet, P., Kersters, K. & Dijkshoorn, L. (1997). Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1179-1187.
- Jentsch, K., Wirtz, A., Circolone, F., Drepper, T., Losi, A., Gartner, W., Jaeger, K. E. & Krauss, U. (2009). Mutual exchange of kinetic properties by extended mutagenesis in two short LOV domain proteins from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **48**, 10321-10333.
- Jiang, Z., Swem, L. R., Rushing, B. G., Devanathan, S., Tollin, G. & Bauer, C. E. (1999). Bacterial photoreceptor with similarity to photoactive yellow protein and plant phytochromes. *Science* **285**, 406-409.
- Jin, J. S., Kwon, S. O., Moon, D. C., Gurung, M., Lee, J. H., Kim, S. I. & Lee, J. C. (2011). *Acinetobacter baumannii* secretes cytotoxic outer membrane protein A via outer membrane vesicles. *PLoS One* **6**, e17027.
- Joly-Guillou, M. L. (2005). Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. *Clin Microbiol Infect* **11**, 868-873.
- Jones, R. M. & Williams, P. A. (2003). Mutational analysis of the critical bases involved in activation of the AreR-regulated sigma54-dependent promoter in *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Appl Environ Microbiol* **69**, 5627-5635.
- Jung, A., Domratcheva, T., Tarutina, M., Wu, Q., Ko, W. H., Shoeman, R. L., Gomelsky, M., Gardner, K. H. & Schlichting, I. (2005). Structure of a bacterial BLUF photoreceptor: insights into blue light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12350-12355.
- Jung, K. H., Trivedi, V. D. & Spudich, J. L. (2003). Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria. *Mol Microbiol* **47**, 1513-1522.

- Juni, E. & Janik, A. (1969). Transformation of *Acinetobacter calco-aceticus* (*Bacterium anitratum*). *J Bacteriol* **98**, 281-288.
- Kalscheuer, R. & Steinbuchel, A. (2003). A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. *J Biol Chem* **278**, 8075-8082.
- Kalscheuer, R., Stolting, T. & Steinbuchel, A. (2006). Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production. *Microbiology* **152**, 2529-2536.
- Kanai, S., Kikuno, R., Toh, H., Ryo, H. & Todo, T. (1997). Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J Mol Evol* **45**, 535-548.
- Kanazawa, T., Ren, S., Maekawa, M., Hasegawa, K., Arisaka, F., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Ohta, H. & Masuda, S. (2010). Biochemical and physiological characterization of a BLUF protein-EAL protein complex involved in blue light-dependent degradation of cyclic diguanylate in the purple bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Biochemistry* **49**, 10647-10655.
- Kaplan, H. B. & Greenberg, E. P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* **163**, 1210-1214.
- Kaplan, N. & Rosenberg, E. (1982). Exopolysaccharide Distribution of and Bioemulsifier Production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Appl Environ Microbiol* **44**, 1335-1341.
- Kaplan, N., Zosim, Z. & Rosenberg, E. (1987). Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein. *Appl Environ Microbiol* **53**, 440-446.
- Kapust, R. B. & Waugh, D. S. (1999). *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* **8**, 1668-1674.
- Kearns, D. B. & Shimkets, L. J. (2001). Lipid chemotaxis and signal transduction in *Myxococcus xanthus*. *Trends Microbiol* **9**, 126-129.
- Khrenova, M., Nemukhin, A. V. & Domratcheva, T. (2013). Photoinduced Electron Transfer Facilitates Tautomerization of the Conserved Signaling Glutamine Side Chain in BLUF Protein Light Sensors. *J Phys Chem B*.
- Kim, D., Baik, K. S., Kim, M. S., Park, S. C., Kim, S. S., Rhee, M. S., Kwak, Y. S. & Seong, C. N. (2008). *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. *J Microbiol* **46**, 396-401.
- Kim, S. W., Choi, C. H., Moon, D. C., Jin, J. S., Lee, J. H., Shin, J. H., Kim, J. M., Lee, Y. C., Seol, S. Y. & other authors (2009). Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* **301**, 224-231.
- Kita, A., Okajima, K., Morimoto, Y., Ikeuchi, M. & Miki, K. (2005). Structure of a cyanobacterial BLUF protein, Tll0078, containing a novel FAD-binding blue light sensor domain. *J Mol Biol* **349**, 1-9.
- Kok, R. G., Christoffels, V. M., Vosman, B. & Hellingwerf, K. J. (1993). Growth-phase-dependent expression of the lipolytic system of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: cloning of a gene encoding one of the esterases. *J Gen Microbiol* **139**, 2329-2342.
- Kok, R. G., Nudel, C. B., Gonzalez, R. H., Nugteren-Roodzant, I. M. & Hellingwerf, K. J. (1996). Physiological factors affecting production of extracellular lipase (LipA) in *Acinetobacter calcoaceticus* BD413: fatty acid repression of *lipA* expression and degradation of LipA. *J Bacteriol* **178**, 6025-6035.
- Kok, R. G., van Thor, J. J., Nugteren-Roodzant, I. M., Brouwer, M. B., Egmond, M. R., Nudel, C. B., Vosman, B. & Hellingwerf, K. J. (1995). Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Mol Microbiol* **15**, 803-818.

- Kraiselburd, I., Alet, A. I., Tondo, M. L., Petrocelli, S., Daurelio, L. D., Monzon, J., Ruiz, O. A., Losi, A. & Orellano, E. G. (2012). A LOV protein modulates the physiological attributes of *Xanthomonas axonopodis* pv. citri relevant for host plant colonization. *PLoS One* **7**, e38226.
- Krauss, U., Losi, A., Gartner, W., Jaeger, K. E. & Eggert, T. (2005). Initial characterization of a blue-light sensing, phototropin-related protein from *Pseudomonas putida*: a paradigm for an extended LOV construct. *Phys Chem Chem Phys* **7**, 2804-2811.
- Kwon, S. O., Gho, Y. S., Lee, J. C. & Kim, S. I. (2009). Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. *FEMS Microbiol Lett* **297**, 150-156.
- La Scola, B., Fournier, P. E., Brouqui, P. & Raoult, D. (2001). Detection and culture of *Bartonella quintana*, *Serratia marcescens*, and *Acinetobacter* spp. from decontaminated human body lice. *J Clin Microbiol* **39**, 1707-1709.
- Laan, W., Bednarz, T., Heberle, J. & Hellingwerf, K. J. (2004). Chromophore composition of a heterologously expressed BLUF-domain. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 1011-1016.
- Laan, W., Gauden, M., Yeremenko, S., van Grondelle, R., Kennis, J. T. & Hellingwerf, K. J. (2006). On the mechanism of activation of the BLUF domain of AppA. *Biochemistry* **45**, 51-60.
- Laan, W., van der Horst, M. A., van Stokkum, I. H. & Hellingwerf, K. J. (2003). Initial characterization of the primary photochemistry of AppA, a blue-light-using flavin adenine dinucleotide-domain containing transcriptional antirepressor protein from *Rhodobacter sphaeroides*: a key role for reversible intramolecular proton transfer from the flavin adenine dinucleotide chromophore to a conserved tyrosine? *Photochem Photobiol* **78**, 290-297.
- Lamparter, T., Michael, N., Mittmann, F. & Esteban, B. (2002). Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11628-11633.
- Lantz, M. S. (1997). Are bacterial proteases important virulence factors? *J Periodontal Res* **32**, 126-132
- Lardizabal, K. D., Metz, J. G., Sakamoto, T., Hutton, W. C., Pollard, M. R. & Lassner, M. W. (2000). Purification of a jojoba embryo wax synthase, cloning of its cDNA, and production of high levels of wax in seeds of transgenic arabidopsis. *Plant Physiol* **122**, 645-655.
- Lautrop, H. (1961). *Bacterium anitratum* transferred to the genus *Cytophaga*. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* **11**, 107-108.
- Lautrop, H. (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
- Lee, H. W., Koh, Y. M., Kim, J., Lee, J. C., Lee, Y. C., Seol, S. Y. & Cho, D. T. (2008). Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect* **14**, 49-54.
- Lin, C. & Todo, T. (2005). The cryptochromes. *Genome Biol* **6**, 220.
- Lin, C. (2002). Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* **14 Suppl**, S207-225.
- Liu, B., Liu, H., Zhong, D. & Lin, C. (2010). Searching for a photocycle of the cryptochrome photoreceptors. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 578-586.
- Loehfelm, T. W., Luke, N. R. & Campagnari, A. A. (2008). Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol* **190**, 1036-1044.
- Losi, A. & Gartner, W. (2008). Bacterial bilin- and flavin-binding photoreceptors. *Photochem Photobiol Sci* **7**, 1168-1178.
- Luke, N. R., Sauberan, S. L., Russo, T. A., Beanan, J. M., Olson, R., Loehfelm, T. W., Cox, A. D., St Michael, F., Vinogradov, E. V. & other authors (2010). Identification and characterization of a

glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infect Immun* **78**, 2017-2023.

**Malhotra, J., Anand, S., Jindal, S., Rajagopal, R. & Lal, R. (2012).** *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 2883-2890.

**Mara, K., Decorosi, F., Viti, C., Giovannetti, L., Papaleo, M. C., Maida, I., Perrin, E., Fondi, M., Vanechoutte, M. & other authors (2012).** Molecular and phenotypic characterization of *Acinetobacter* strains able to degrade diesel fuel. *Res Microbiol* **163**, 161-172.

**Marti, S., Nait Chabane, Y., Alexandre, S., Coquet, L., Vila, J., Jouenne, T. & De, E. (2011).** Growth of *Acinetobacter baumannii* in pellicle enhanced the expression of potential virulence factors. *PLoS One* **6**, e26030.

**Masuda, S. & Bauer, C. E. (2002).** AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell* **110**, 613-623.

**Mathews, S. (2006).** Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments. *Mol Ecol* **15**, 3483-3503.

**McClean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S. & other authors (1997).** Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* **143** ( Pt 12), 3703-3711.

**McQueary, C. N., Kirkup, B. C., Si, Y., Barlow, M., Actis, L. A., Craft, D. W. & Zurawski, D. V. (2012).** Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. *J Microbiol* **50**, 434-443.

**Merz, A. J., So, M. & Sheetz, M. P. (2000).** Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* **407**, 98-102.

**Metzgar, D., Bacher, J. M., Pezo, V., Reader, J., Doring, V., Schimmel, P., Marliere, P. & de Crecy-Lagard, V. (2004).** *Acinetobacter* sp. ADP1: an ideal model organism for genetic analysis and genome engineering. *Nucleic Acids Res* **32**, 5780-5790.

**Meyer, T. E., Yakali, E., Cusanovich, M. A. & Tollin, G. (1987).** Properties of a water-soluble, yellow protein isolated from a halophilic phototrophic bacterium that has photochemical activity analogous to sensory rhodopsin. *Biochemistry* **26**, 418-423.

**Miller, J. M. (1982).** Experiments in molecular genetics. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Miller, R. M., Tomaras, A. P., Barker, A. P., Voelker, D. R., Chan, E. D., Vasil, A. I. & Vasil, M. L. (2008).** *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility-mediated chemotaxis towards phospholipids and fatty acids: specificity and metabolic requirements. *J Bacteriol* **190**, 4038-4049.

**Moller, A., Sagasser, S., Wiltschko, W. & Schierwater, B. (2004).** Retinal cryptochrome in a migratory passerine bird: a possible transducer for the avian magnetic compass. *Naturwissenschaften* **91**, 585-588.

**Moskvin, O. V., Kaplan, S., Gilles-Gonzalez, M. A. & Gomelsky, M. (2007).** Novel heme-based oxygen sensor with a revealing evolutionary history. *J Biol Chem* **282**, 28740-28748.

**Mussi, M. A., Gaddy, J. A., Cabruja, M., Arivett, B. A., Viale, A. M., Rasia, R. & Actis, L. A. (2010).** The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol* **192**, 6336-6345.

**NCBI-Resource-Coordinators (2012).** Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* **41**, D8-D20.

**Nealson, K. H., Platt, T. & Hastings, J. W. (1970).** Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**, 313-322.

- Nemec, A., De Baere, T., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., van der Reijden, T. J. & Dijkshoorn, L. (2001). *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1891-1899.
- Nemec, A., Dijkshoorn, L., Cleenwerck, I., De Baere, T., Janssens, D., Van Der Reijden, T. J., Jezek, P. & Vaneechoutte, M. (2003). *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1563-1567.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T. J., Deschaght, P., Passet, V., Vaneechoutte, M., Brisse, S. & Dijkshoorn, L. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol* **162**, 393-404.
- Nemec, A., Musilek, M., Maixnerova, M., De Baere, T., van der Reijden, T. J., Vaneechoutte, M. & Dijkshoorn, L. (2009). *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 118-124.
- Nemec, A., Musilek, M., Sedo, O., De Baere, T., Maixnerova, M., van der Reijden, T. J., Zdrahal, Z., Vaneechoutte, M. & Dijkshoorn, L. (2010). *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 896-903.
- Nishimura, Y., Ino, T. & Lizuka, H. (1988). *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. *Int J Syst Bacteriol* **38**, 209-211.
- Niu, C., Clemmer, K. M., Bonomo, R. A. & Rather, P. N. (2008). Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* **190**, 3386-3392.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J. & Buchanan, S. K. (2010). TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol* **64**, 43-60.
- Ntefidou, M., Iseki, M., Watanabe, M., Lebert, M. & Hader, D. P. (2003). Photoactivated adenylyl cyclase controls phototaxis in the flagellate *Euglena gracilis*. *Plant Physiol* **133**, 1517-1521.
- Nudel, C., González, R., Castaneda, N., Mahler, G. & Actis, L. A. (2001). Influence of iron on growth, production of siderophore compounds, membrane proteins, and lipase activity in *Acinetobacter calcoaceticus* BD 413. *Microbiol Res* **155**, 263-269.
- Okajima, K., Yoshihara, S., Fukushima, Y., Geng, X., Katayama, M., Higashi, S., Watanabe, M., Sato, S., Tabata, S. & other authors (2005). Biochemical and functional characterization of BLUF-type flavin-binding proteins of two species of cyanobacteria. *J Biochem* **137**, 741-750.
- Ortiz de Orue Lucana, D., Wedderhoff, I. & Groves, M. R. ROS-Mediated Signalling in Bacteria: Zinc-Containing Cys-X-X-Cys Redox Centres and Iron-Based Oxidative Stress. *J Signal Transduct* **2012**, 605905.
- Palmen, R., Vosman, B., Buijsman, P., Breek, C. K. & Hellingwerf, K. J. (1993). Physiological characterization of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Gen Microbiol* **139**, 295-305.
- Parker, C. T. & Sperandio, V. (2009). Cell-to-cell signalling during pathogenesis. *Cell Microbiol* **11**, 363-369.
- Patriquin, G. M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E. P. & Poole, K. (2008). Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **190**, 662-671.
- Peleg, A. Y., Seifert, H. & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* **21**, 538-582.
- Penzkofer, A., Stierl, M., Hegemann, P. & Kateriya, S. (2011). Photo-dynamics of the BLUF domain containing soluble adenylylase cyclase (nPAC) from the amoeboflagellate *Naegleria gruberi* NEG-M strain. *Chemical Physics* **387**, 25-38.

- Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N. & Bonomo, R. A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3471-3484.
- Pier, G. B. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol* **297**, 277-295.
- Poirel, L., Menuteau, O., Agoli, N., Cattoen, C. & Nordmann, P. (2003). Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* **41**, 3542-3547.
- Porstendorfer, D., Drotschmann, U. & Averhoff, B. (1997). A novel competence gene, *comP*, is essential for natural transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4150-4157.
- Propst, T. L., Lochmiller, R. L., Qualls, C. W., Jr. & McBee, K. (1999). In situ (mesocosm) assessment of immunotoxicity risks to small mammals inhabiting petrochemical waste sites. *Chemosphere* **38**, 1049-1067.
- Provencio, I., Jiang, G., De Grip, W. J., Hayes, W. P. & Rollag, M. D. (1998). Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 340-345.
- Purcell, E. B., Siegal-Gaskins, D., Rawling, D. C., Fiebig, A. & Crosson, S. (2007). A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 18241-18246.
- Qualls, G. T., Stephens, K. & White, D. (1978). Light-stimulated morphogenesis in the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Science* **201**, 444-445.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Deprez, R. H. & Moorman, A. F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* **339**, 62-66.
- Rashid, M. H. & Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4885-4890.
- Ratledge, C. & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**, 881-941.
- Rockwell, N. C. & Lagarias, J. C. (2006). The structure of phytochrome: a picture is worth a thousand spectra. *Plant Cell* **18**, 4-14.
- Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C. & Gutnick, D. L. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl Environ Microbiol* **37**, 402-408.
- Rossau, R., van Landschoot, A., Gillis, M. & De ley, J. (1991). Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and Related Organisms. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 310-319.
- Ruby, E. G. & Asato, L. M. (1993). Growth and flagellation of *Vibrio fischeri* during initiation of the sepiolid squid light organ symbiosis. *Arch Microbiol* **159**, 160-167.
- Ruby, E. G. (1999). The *Euprymna scolopes*-*Vibrio fischeri* symbiosis: a biomedical model for the study of bacterial colonization of animal tissue. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 13-21.
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M. J. & Moorman, A. F. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* **37**, e45.
- Russo, T. A., Luke, N. R., Beanan, J. M., Olson, R., Sauberan, S. L., MacDonald, U., Schultz, L. W., Umland, T. C. & Campagnari, A. A. (2010). The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun* **78**, 3993-4000.
- Ryan, K. J., Ray, C. G. & Sherris, J. C. (2004). *Microbiología médica: una introducción a las enfermedades infecciosas*. McGrawHill.
- Ryu, M. H., Moskvina, O. V., Siltberg-Liberles, J. & Gomelsky, M. (2010). Natural and engineered photoactivated nucleotidyl cyclases for optogenetic applications. *J Biol Chem* **285**, 41501-41508.



- Sadeghian, K., Bocola, M. & Schutz, M. (2008).** A conclusive mechanism of the photoinduced reaction cascade in blue light using flavin photoreceptors. *J Am Chem Soc* **130**, 12501-12513.
- Santala, S., Efimova, E., Kivinen, V., Larjo, A., Aho, T., Karp, M. & Santala, V.** Improved triacylglycerol production in *Acinetobacter baylyi* ADP1 by metabolic engineering. *Microb Cell Fact* **10**, 36.
- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Puhler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.
- Schmitz, O., Katayama, M., Williams, S. B., Kondo, T. & Golden, S. S. (2000).** CikA, a bacteriophytochrome that resets the cyanobacterial circadian clock. *Science* **289**, 765-768.
- Schneider, M., Tognolli, M. & Bairoch, A. (2004).** The Swiss-Prot protein knowledgebase and ExPASy: providing the plant community with high quality proteomic data and tools. *Plant Physiol Biochem* **42**, 1013-1021.
- Schwerdtfeger, C. & Linden, H. (2003).** VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. *EMBO J* **22**, 4846-4855.
- Scott, P., Deye, G., Srinivasan, A., Murray, C., Moran, K., Hulten, E., Fishbain, J., Craft, D., Riddell, S. & other authors (2007).** An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. *Clin Infect Dis* **44**, 1577-1584.
- Shen, C. C., Wu, J. Y., Chen, C. Y. & Chen, T. L. (1999).** Lipase Production by *Acinetobacter radioresistens* in the Presence of a Nonwoven Fabric. *Biotechnol Prog* **15**, 919-922.
- Shimada, H., Iba, K. & Takamiya, K. (1992).** Blue-light irradiation reduces the expression of *puf* and *puc* operons of *Rhodobacter sphaeroides* under semi-aerobic conditions. *Plant Cell Physiol* **33**, 471-475.
- Sineshchekov, O. A., Jung, K. H. & Spudich, J. L. (2002).** Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8689-8694.
- Skerker, J. M. & Berg, H. C. (2001).** Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6901-6904.
- Smith, M. G., Gianoulis, T. A., Pukatzki, S., Mekalanos, J. J., Ornston, L. N., Gerstein, M. & Snyder, M. (2007).** New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev* **21**, 601-614.
- Spain, J. C., Nishino, S. F., Witholt, B., Tan, L. S. & Duetz, W. A. (2003).** Production of 6-phenylacetylene picolinic acid from diphenylacetylene by a toluene-degrading *Acinetobacter* strain. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4037-4042.
- Sprenger, W. W., Hoff, W. D., Armitage, J. P. & Hellingwerf, K. J. (1993).** The eubacterium *Ectothiorhodospira halophila* is negatively phototactic, with a wavelength dependence that fits the absorption spectrum of the photoactive yellow protein. *J Bacteriol* **175**, 3096-3104.
- Spudich, J. L., Yang, C. S., Jung, K. H. & Spudich, E. N. (2000).** Retinylidene proteins: structures and functions from archaea to humans. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 365-392.
- Steindler, L. & Venturi, V. (2007).** Detection of quorum-sensing N-acyl homoserine lactone signal molecules by bacterial biosensors. *FEMS Microbiol Lett* **266**, 1-9.
- Stevens, A. M. & Greenberg, E. P. (1997).** Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J Bacteriol* **179**, 557-562.
- Stewart, C. R., Rossier, O. & Cianciotto, N. P. (2009).** Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion. *J Bacteriol* **191**, 1537-1546.

- Stierl, M., Stumpf, P., Udvari, D., Gueta, R., Hagedorn, R., Losi, A., Gartner, W., Petereit, L., Efetova, M. & other authors (2011). Light modulation of cellular cAMP by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bPAC, of the soil bacterium *Beggiatoa*. *J Biol Chem* **286**, 1181-1188.
- Subramoni, S. & Venturi, V. (2009). LuxR-family 'solos': bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology* **155**, 1377-1385.
- Sun, H., Zusman, D. R. & Shi, W. (2000). Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the frz chemosensory system. *Curr Biol* **10**, 1143-1146.
- Swartz, T. E., Tseng, T. S., Frederickson, M. A., Paris, G., Comerci, D. J., Rajashekara, G., Kim, J. G., Mudgett, M. B., Splitter, G. A. & other authors (2007). Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* **317**, 1090-1093.
- Sze, I. S. & Dagley, S. (1987). Degradation of substituted mandelic acids by meta fission reactions. *J Bacteriol* **169**, 3833-3835.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.
- Tayabali, A. F., Nguyen, K. C., Shwed, P. S., Crosthwait, J., Coleman, G. & Seligy, V. L. (2012). Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources. *PLoS One* **7**, e37024.
- Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**, 711-721.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Tjernberg, I. & Ursing, J. (1989). Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* **97**, 595-605.
- Toh, K. C., van Stokkum, I. H., Hendriks, J., Alexandre, M. T., Arents, J. C., Perez, M. A., van Grondelle, R., Hellingwerf, K. J. & Kennis, J. T. (2008). On the signaling mechanism and the absence of photoreversibility in the AppA BLUF domain. *Biophys J* **95**, 312-321.
- Tomaras, A. P., Dorsey, C. W., Edelmann, R. E. & Actis, L. A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* **149**, 3473-3484.
- Tomaras, A. P., Flagler, M. J., Dorsey, C. W., Gaddy, J. A. & Actis, L. A. (2008). Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology* **154**, 3398-3409.
- Towner, K. (2006). The genus *Acinetobacter*. In *The Prokaryotes: Proteobacteria: Gamma Subclass*, 3<sup>rd</sup> edn, vol. 6, pp. 746-758. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer.
- Towner, K. J. (2009). *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect* **73**, 355-363.
- Tschowri, N., Busse, S. & Hengge, R. (2009). The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes Dev* **23**, 522-534.
- Vallenet, D., Nordmann, P., Barbe, V., Poirel, L., Mangenot, S., Bataille, E., Dossat, C., Gas, S., Kreimeyer, A. & other authors (2008). Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PLoS One* **3**, e1805.

- van der Horst, M. A. & Hellingwerf, K. J. (2004).** Photoreceptor proteins, "star actors of modern times": a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Acc Chem Res* **37**, 13-20.
- van der Horst, M. A., Key, J. & Hellingwerf, K. J. (2007).** Photosensing in chemotrophic, non-phototrophic bacteria: let there be light sensing too. *Trends Microbiol* **15**, 554-562.
- Vaneechoutte, M., Nemeč, A., Musilek, M., van der Reijden, T. J., van den Barselaar, M., Tjernberg, I., Calame, W., Fani, R., De Baere, T. & other authors (2009).** Description of *Acinetobacter venetianus* ex Di Cello et al. 1997 sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1376-1381.
- Vaneechoutte, M., Young, D. M., Ornston, L. N., De Baere, T., Nemeč, A., Van Der Reijden, T., Carr, E., Tjernberg, I. & Dijkshoorn, L. (2006).** Naturally transformable *Acinetobacter* sp. strain ADP1 belongs to the newly described species *Acinetobacter baylyi*. *Appl Environ Microbiol* **72**, 932-936.
- Vaz-Moreira, I., Novo, A., Hantsis-Zacharov, E., Lopes, A. R., Gomila, M., Nunes, O. C., Manaia, C. M. & Halpern, M. (2011).** *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 2837-2843.
- Vazquez, S., Ruberto, L. & Mac Cormack, W. (2005).** Properties of extracellular proteases from three psychrotolerant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Antarctic soil. *Polar Biol* **28**, 319-325.
- Vincent, J. L., Bihari, D. J., Suter, P. M., Bruining, H. A., White, J., Nicolas-Chanoin, M. H., Wolff, M., Spencer, R. C. & Hemmer, M. (1995).** The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* **274**, 639-644.
- Wang, J. T., McDonald, L. C., Chang, S. C. & Ho, M. (2002).** Community-acquired *Acinetobacter baumannii* bacteremia in adult patients in Taiwan. *J Clin Microbiol* **40**, 1526-1529.
- Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E. & Ruden, H. (1997).** Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol* **35**, 1394-1397.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M., Slater, H., Simpson, N. J. & Salmond, G. P. (2001).** Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**, 365-404.
- Winkelmann, G. (2002).** Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans* **30**, 691-696.
- Yamamoto, S., Okujo, N. & Sakakibara, Y. (1994).** Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii*. *Arch Microbiol* **162**, 249-254.
- Yuan, H. & Bauer, C. E. (2008).** PixE promotes dark oligomerization of the BLUF photoreceptor PixD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11715-11719.