

*Bases moleculares e implicancia de la
hipermutabilidad en la conversión y
reversión a fenotipos adaptados al biofilm en
Pseudomonas aeruginosa*

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

Por

MIC. ROMINA ALÍN TOBARES

DIRECTORA: DRA. ANDREA M. SMANIA

CONICET



Universidad
Nacional
de Córdoba

C I Q U I B I C

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA BIOLÓGICA DE CÓRDOBA CIQUIBIC – CONICET
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA, FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

2017

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Andrea SMANIA

COMISIÓN DE TESIS:

Dra. Claudia SOTOMAYOR

Dra. Cecilia BECERRA

Dr. José BOCCO

EVALUADOR EXTERNO:

Dra. Claudia STUDDERT

ÍNDICE

RESUMEN -----	1
INTRODUCCIÓN -----	5
1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA, UN CLARO EJEMPLO DE PATOGÉNESIS OPORTUNISTA.....	7
2. PSEUDOMONAS AERUGINOSA, EL PRINCIPAL AGENTE ETIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA	9
2.1. MICROEVOLUCIÓN DE P. AERUGINOSA EN INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS EN PACIENTES CON FQ: ESTRATEGIAS ADAPTATIVAS Y DE PERSISTENCIA.	11
2.1.1. Crecimiento en biofilms.....	12
2.1.2. Diversificación fenotípica.....	15
2.1.2.1. Las variantes de colonias pequeñas (SCV) de P. aeruginosa.	17
2.1.3. Hipermutabilidad en FQ.....	18
2.1.3.1. Hipermutabilidad estable por deficiencia en el sistema de corrección de bases apareadas incorrectamente (MRS).....	20
3. INTERRELACIÓN ENTRE EL PROCESO DE FORMACIÓN DE BIOFILMS, LA DIVERSIFICACIÓN FENOTÍPICA Y LA HIPERMUTABILIDAD ESTABLE EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	22
3.1. HIPERMUTABILIDAD Y CONVERSIÓN AL FENOTIPO MUCOSO EN P. AERUGINOSA.	23
OBJETIVOS -----	27
1. OBJETIVO GENERAL.....	28
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
RESULTADOS -----	30
CAPÍTULO I. ESTUDIO COMPARATIVO DEL PROCESO DE CONVERSIÓN Y REVERSIÓN AL FENOTIPO SCV EN CEPAS NORMOMUTADORAS E HIPERMUTADORAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA.	31
1.1. Caracterización de variantes SCV y variantes revertidas obtenidas a partir de cepas de P. aeruginosa normomutadoras e hipermutadoras.	32
1.2. Diversificación fenotípica y frecuencia de reversión del fenotipo SCV.....	35

1.3. Análisis de la competitividad de las variantes SCV normomutadoras e hipermutadoras.....	38
CAPÍTULO II. FLEXIBILIDAD GENÉTICA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA EN EL PROCESO DE CONVERSIÓN Y REVERSIÓN AL FENOTIPO SCV EN ENSAYOS EVOLUTIVOS IN VITRO: IMPLICANCIA DE LA HIPERMUTABILIDAD.	45
2.1. Modelo de evolución in vitro.	46
2.2. Determinación de la flexibilidad genética de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> normomutadoras para la conversión y reversión SCV en forma sucesiva.....	48
2.3. Caracterización fenotípica de las líneas evolutivas de <i>P. aeruginosa</i> obtenidas a partir del experimento de evolución.....	53
CAPÍTULO III: BASES MOLECULARES DE LA CONVERSIÓN Y REVERSIÓN AL FENOTIPO SCV EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA MEDIANTE ESTUDIOS DE GENÓMICA ESTRUCTURAL COMPARATIVA.....	58
3.1. Análisis de la base molecular de la conversión y reversión SCV sucesiva mediante genómica comparativa.	59
3.2. Análisis de las líneas evolutivas de <i>P. aeruginosa</i> derivadas del ancestro normomutador.	60
3.2.1. Línea evolutiva WT1.....	69
3.2.2. Línea evolutiva WT2.	73
3.2.3. Línea evolutiva WT3.	75
3.2.4. Línea evolutiva WT4.	80
3.2.5. Línea evolutiva WT5.	81
3.2.6. Indicios de evolución paralela en las líneas evolutivas de <i>P. aeruginosa</i> normomutadoras.....	82
3.3. Análisis de las líneas evolutivas de <i>P. aeruginosa</i> derivadas del ancestro hipermutador.....	85
3.3.1. Línea evolutiva mutS1.	92
3.3.2. Línea evolutiva mutS2.....	93
3.3.3. Adaptación de <i>P. aeruginosa</i> en las 4 líneas evolutivas hipermutadoras.	95
DISCUSIÓN -----	99
CONCLUSIONES -----	113
MATERIALES Y MÉTODOS-----	116
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	135

ABREVIATURAS

c-di-GMP	3',5'-diguanylate cíclico
CFTR	Proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
CIM	Concentración inhibitoria mínima
DGC	Diguanylate ciclasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FDE	Fosfodiesterasa
FQ	Fibrosis quística
GATK	<i>Genome Analysis Toolkit</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
GMP	Guanosina monofosfato
GTP	Guanosina trifosfato
INDEL	Mutación de inserción/delección
MLM	Modelo estadístico lineal de efectos mixtos
MRS	Sistema de reparación de bases apareadas incorrectamente
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
ON	Incubación durante toda la noche
p3	Vector pBBR1MCS-3
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pGpG	5'-fosfoguanilil-(3',5')-guanosina
pol IV	ADN polimerasa IV
QS	Sistema de <i>quorum sensing</i>
REV	Variante revertida
RPM	Revoluciones por minuto
SCV	Variantes de colonia pequeña
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
SSR	Secuencia repetida simple de ADN
VCF	<i>Variant Calling Format</i>
VEP	Volumen espiratorio forzado

RESUMEN

La mutagénesis es uno de los mecanismos esenciales involucrados en la generación de variabilidad genética y en la adquisición de fenotipos adaptativos en bacterias. En este sentido, frente a cambios ambientales repentinos o en la colonización de nuevos nichos ecológicos, un incremento en la tasa de mutación aumenta la probabilidad de adquirir aquellos fenotipos beneficiosos, constituyendo de esta manera una estrategia clave para la adaptación. Particularmente, las infecciones pulmonares crónicas causadas por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística (FQ) exhiben una alta prevalencia de cepas con una tasa de mutación espontánea incrementada, denominadas hipermutadoras, fundamentalmente asociada a la emergencia de mutantes deficientes en el sistema de reparación de bases apareadas incorrectamente (MRS). En este contexto, *P. aeruginosa* se desarrolla en las vías aéreas del pulmón FQ en un estilo de vida denominado biofilm, en donde las bacterias crecen adheridas a la mucosa respiratoria a través de una matriz de exopolisacáridos por ellas producida y exhiben características morfológicas y metabólicas diferentes a las expresadas durante el crecimiento planctónico. Este estilo de vida está asociado a un proceso de diversificación que implica la emergencia, selección y fijación de múltiples variantes fenotípicas a través de la adquisición de mutaciones beneficiosas. En contrapartida, durante la etapa de dispersión del biofilm, la cual consiste en el desprendimiento de las células desde el biofilm maduro, se produce una reversión de parte de estos rasgos adaptativos y las células vuelven a un estadio de vida planctónico, brindando la posibilidad de colonizar nuevos nichos y propagar la infección. Así, los procesos de formación y dispersión de biofilms suponen la emergencia y reversión de morfotipos específicamente adaptados. Debido a que ambos fenómenos estarían basados en mecanismos mutagénicos, un incremento en la tasa de mutación podría resultar beneficioso y favorecer el proceso completo. Dentro de este marco teórico, el objetivo principal de este estudio consistió en estudiar la flexibilidad de *P. aeruginosa* para diversificar y revertir en forma sucesiva a fenotipos característicos del crecimiento en biofilms y al mismo tiempo estudiar cuál es la implicancia de la hipermutabilidad en dicho proceso. Para ello, se utilizó como modelo al fenotipo de colonias pequeñas (SCV) de *P. aeruginosa*, uno de los morfotipos adaptados e hiperproductores de biofilms, el cual fue ensayado en cuanto a su emergencia y reversión en un ensayo de evolución *in vitro* experimental. Este ensayo fue realizado de manera repetida y sucesiva,

analizando en paralelo líneas evolutivas independientemente fundadas a partir de un ancestro normomutador e hipermutador común.

Los resultados obtenidos demuestran que la flexibilidad en la conversión y reversión sucesiva al fenotipo SCV se encuentra favorecida ante un aumento en la tasa de mutación. En este sentido, el proceso de diversificación fenotípica así como el valor de frecuencia de reversión del fenotipo SCV fueron notablemente mayores en cepas hipermutadoras respecto a la cepa normomutadora, incluso cuando las propiedades fenotípicas de las SCV y sus respectivas variantes revertidas y ancestrales fueron similares. Mediante análisis de genómica estructural comparativa, se determinó que la base molecular que subyace al proceso de conversión/reversión SCV consiste en la regulación de los niveles intracelulares del segundo mensajero c-di-GMP, existiendo un marcado paralelismo evolutivo y una fuerte selección positiva, tanto en las líneas WT como en las hipermutadoras, para la mutagénesis de los sistemas de transducción *wsp* e *yfi*. En todos los casos, las mutaciones en estos sistemas se adquieren de un modo compensatorio, determinando el incremento y la disminución de los niveles de c-di-GMP en cada ciclo de conversión y reversión, respectivamente. Interesantemente, a medida que los ciclos evolutivos avanzan las líneas normomutadoras muestran a partir del ciclo 5 de evolución una fuerte restricción genética, evidenciada como una caída significativa en la frecuencia de conversión SCV. Esta restricción no fue observada para las líneas hipermutadoras, las cuales evolucionaron hasta el ciclo de evolución 16 inclusive. A partir del ciclo 5 de evolución, estas líneas muestran la adquisición de mutaciones en otras enzimas y reguladores involucrados en el metabolismo del c-di-GMP, las cuales no serían suficientes para adaptarse al esquema impuesto sosteniendo puramente un mecanismo de mutaciones compensatorias. La presencia de mutaciones de tipo inserción/delección en secuencias repetidas pequeñas (SSR) de G:C en algunos genes implicados en la regulación de los niveles de este segundo mensajero, abren la posibilidad de que la mayor flexibilidad y adaptabilidad de las líneas hipermutadoras se base a su vez en un mecanismo de conversión y reversión de una misma mutación (“*switch on/off mutations*”), el que, a manera de un interruptor genético, permitiría la variación fenotípica de manera indefinida.

El presente trabajo constituye un importante aporte para el conocimiento de la implicancia de la hipermutabilidad, por deficiencia en el MRS, en la

adaptabilidad de *P. aeruginosa*, la cual subyace la notable versatilidad que esta especie bacteriana despliega para prosperar en un sin número de ambientes diferentes y, como patógeno oportunista, persistir en las vías aéreas de pacientes con FQ a lo largo de la vida del paciente sin poder ser erradicada por ninguna terapia hasta el momento conocida.

INTRODUCCIÓN

Una de las razones del éxito ecológico de las bacterias es su notable capacidad para responder a condiciones ambientales cambiantes y a una amplia gama de nichos ecológicos diferentes. El término plasticidad fenotípica se relaciona a la presencia de circuitos sensores-respuesta, mediante los cuales la modulación del fenotipo se realiza a través de cambios fisiológicos (por lo general reversibles) producidos por la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional y postranscripcional [1]. Adicionalmente, frente a un cambio ambiental, la bacteria puede sufrir un proceso adaptativo, el cual depende de la diversidad genética presente en la población y de la posterior selección de los fenotipos adaptados. Al ser las bacterias organismos que forman poblaciones clonales de gran tamaño, las mutaciones constituyen la principal fuente de variabilidad genética y la mayor fuerza motora de evolución [2]. La adquisición de mutaciones es un fenómeno mediado por azar [3], independiente del ambiente y que se manifiesta de manera previa a la presencia de una presión selectiva [4]. En este sentido, frente a cambios ambientales repentinos o frente a la colonización de nuevos nichos ecológicos, un incremento en la tasa de mutación resultaría beneficioso, dado que incrementaría la diversidad genética poblacional y favorecería la emergencia de alelos novedosos e individuos adaptados a la nueva condición ambiental [5-8]. Sin embargo, la probabilidad de que una mutación resulte benéfica es por lo general muy baja, siendo más frecuente un efecto deletéreo o neutro [9,10]. Es por ello que la tasa de mutación global de los organismos se encuentra finamente regulada y tiende a mantenerse lo más baja posible [10], de manera que la evolución microbiana depende de un regulado balance entre el mantenimiento de la información genética y la ocurrencia de mutaciones como fuentes de diversidad [9,10].

Son numerosos los sistemas que se encargan del mantenimiento de la integridad genómica, a través de maquinarias de replicación del ADN de alta fidelidad o de sistemas que reparan el material genético [11,12]. Como contrapartida, existen diversos mecanismos que permiten un incremento en la tasa de mutación, generando estados de hipermutabilidad a través de la deficiencia en los sistemas de prevención y/o reparación de mutaciones, de la acción de ADN polimerasas de baja fidelidad o de la alta propensión de ciertas secuencias de ADN a ser mutadas.

Las cepas bacterianas que poseen una elevada tasa de mutación se denominan hipermutadoras y su frecuencia en poblaciones naturales es directamente proporcional al grado de estrés que el ambiente ocasiona [2]. En este sentido, se ha observado que en poblaciones de bacterias comensales y ambientales, así como en procesos infecciosos agudos, las hipermutadoras alcanzan una frecuencia relativamente baja, cercana al 1% [13,14]. Por su lado, en procesos infecciosos crónicos, en donde la persistencia de la bacteria se basa en una adaptación constante a cambios ambientales producidos por el ataque del sistema inmune y el tratamiento con antimicrobianos, las hipermutadoras pueden representar hasta el 50% de la población [13,15-22]. Dado que la disponibilidad de mutaciones frente a estos ambientes heterogéneos y cambiantes requiere ser mayor, se ha postulado que las cepas hipermutadoras se seleccionan a través de un mecanismo de co-selección o “*hitchhiking*”, en el que la mutación que genera la hipermutabilidad va ligada a una mutación beneficiosa (por ejemplo, de resistencia a antibióticos) que es la que el ambiente selecciona [6,23].

De esta manera, la relación establecida entre los distintos sistemas o factores que controlan la tasa de mutación y la adaptabilidad jugaría un papel fundamental tanto en la evolución como en la patogenicidad bacteriana. Dentro de este marco conceptual, las investigaciones desarrolladas en este trabajo de tesis permiten avanzar en el entendimiento de la implicancia de la hipermutabilidad en procesos de adaptación en la bacteria patógena oportunista *Pseudomonas aeruginosa*.

1. PSEUDOMONAS AERUGINOSA, UN CLARO EJEMPLO DE PATOGÉNESIS OPORTUNISTA

P. aeruginosa es una bacteria extremadamente versátil, se encuentra en una amplia variedad de ambientes naturales, incluyendo ambientes acuáticos y de suelo, así como también asociada a plantas y animales [24,25]. Asociada al hombre, esta bacteria “aprovecha” la ruptura de la barrera cutáneo-mucosa, dada por la presencia de heridas complejas o quemaduras, así como cualquier alteración en el sistema inmunológico del huésped para producir infecciones. En estas condiciones, *P. aeruginosa* es capaz de infectar prácticamente cualquier tejido, constituyendo un claro ejemplo de patógeno oportunista [24,26-28]. Así, es capaz de producir un amplio rango de infecciones que pueden variar de locales a

sistémicas, de subagudas a crónicas y de leves a potencialmente mortales [28]. Asimismo, muchas infecciones causadas por este patógeno están asociadas a productos médicos, tales como prótesis, catéteres y respiradores, aumentando su relevancia a nivel clínico [29,30].

Entre las características principales que contribuyen al potencial patogénico de *P. aeruginosa* se destaca una marcada versatilidad metabólica, la resistencia intrínseca y/o adquirida a antibióticos y la gran cantidad de factores de virulencia que posee y expresa de manera secuencial de acuerdo a las diferentes etapas de la infección. En este sentido, la maquinaria de virulencia de *P. aeruginosa* está compuesta tanto de elementos asociados a la superficie bacteriana (como flagelo, pilis y lipopolisacáridos), a factores de secreción (como elastasas, proteasas, exotoxina A, piocianina, sideróforos, hemolisinas, etc), así como numerosos sistemas regulatorios que promueven cambios en la expresión génica, facilitando la transición desde los reservorios ambientales primariamente habitados por la bacteria al hospedador [30-32]. De esta manera, la capacidad de *P. aeruginosa* de causar infecciones depende de una compleja serie de redes regulatorias que le permiten coordinar los cambios fenotípicos necesarios para su adaptación y virulencia.

Particularmente, *P. aeruginosa* está asociada a múltiples procesos infecciosos agudos entre los que se pueden mencionar: bacteriemias [33,34], infecciones del tracto urinario [29,35], infecciones en pacientes quemados [36,37], foliculitis [38,39], ectima gangrenoso [40,41] y distintas infecciones oculares tales como la queratitis severa [42,43], entre otras. A su vez, es el microorganismo más comúnmente vinculado a infecciones nosocomiales [44,45], donde las neumonías intrahospitalarias en las unidades de cuidados intensivos son de gran importancia por la elevada mortalidad que ocasionan [45,46]. Pero, donde radica la mayor relevancia clínica de *P. aeruginosa* es como el agente etiológico de las infecciones pulmonares crónicas que sufren pacientes con Fibrosis Quística (FQ), en los cuales constituye la principal causa de morbilidad y mortalidad [26-28,47-51]. La persistencia de esta bacteria durante estas infecciones crónicas está relacionada a múltiples y sofisticados mecanismos de adaptación que incluyen: i) la capacidad de crecer adherida a la mucosa del huésped en un estilo de vida denominado “*biofilms*”; ii) la diversificación fenotípica; y iii) el incremento en la tasa de mutación. Como se detallará en profundidad en las secciones siguientes, estos

mecanismos adaptativos están, a su vez, íntimamente relacionados entre sí, confiriendo a este microorganismo una capacidad de supervivencia que permite que una vez establecida, la bacteria sea prácticamente imposible de erradicar.

El genoma de *P. aeruginosa* es uno de los más grandes dentro del mundo de las bacterias. Posee un tamaño entre 5,2 a 7 Mpb representado en un único cromosoma circular y un número variable de plásmidos [52,53]. Codifica para cerca de 6000 genes, dentro de los cuales alrededor de 500 constituyen reguladores globales. Como otra particularidad, el genoma de *P. aeruginosa* posee un alto número de genes que codifican para proteínas de membrana externa relacionadas a la adhesión, motilidad, eflujo de antibióticos, secreción de factores de virulencia y sistemas de transducción de señales de dos componentes. Al mismo tiempo, posee un gran número de genes que codifican para enzimas catalíticas o de transporte y metabolismo de nutrientes [52,53]. De esta manera, basada en la vasta información codificada en su genoma, *P. aeruginosa* es capaz de coordinar caminos metabólicos, optimizar su potencial reproductivo y nutricional de acuerdo a las condiciones y recursos del medio externo y consecuentemente sobrevivir en ambientes diversos y cambiantes, desplegando una increíble versatilidad. En este sentido, el conocimiento de la estructura, información y organización genómica resulta clave para comprender la biología de *P. aeruginosa*, a la vez que el estudio de aquellos mecanismos implicados en la modulación y dinámica de la información genética, permitirían comprender cómo la bacteria coordina y/o modifica su genoma, logrando un ajuste acorde a las necesidades de supervivencia en, virtualmente, cualquier ambiente [54-56].

2. PSEUDOMONAS AERUGINOSA, EL PRINCIPAL AGENTE ETIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS EN PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

La FQ es una enfermedad autosómica recesiva causada por la mutación en un único gen que codifica para la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, por sus siglas del inglés *C*ystic *F*ibrosis *T*ransmembrane conductance *R*egulator) [57-61]. Esta alteración, afecta a los tejidos de secreción exócrina principalmente en los pulmones y los sistemas digestivos y reproductivos del paciente, aunque también se han reportado alteraciones en las glándulas secretorias y sudoríparas [62-64]. Si bien la FQ es una

afección multistémica, sus efectos sobre el sistema respiratorio son los más relevantes a nivel clínico, debido a la alta tasa de mortalidad asociada a infecciones bacterianas crónicas que conllevan consecuentemente a la falla de la función pulmonar [49,65].

En las vías aéreas, la principal función de la proteína CFTR es facilitar el transporte activo de iones de cloro hacia el espacio extracelular de las membranas apicales de las células endoteliales productoras de mucus [61]. En condiciones normales, el CFTR controla el transporte de agua, regulando la producción de una delgada capa fluida de mucus que protege la superficie de las células [61]. La pérdida de función del CFTR altera la secreción endotelial, creando un gradiente osmótico que provoca la reabsorción de agua [57,66]. Consecuentemente, se produce la acumulación de una secreción espesa y pegajosa que interfiere con el movimiento ciliar y con la actividad de moléculas antimicrobianas que forman parte de la respuesta inmunológica innata. El proceso se retroalimenta de la siguiente manera: las secreciones acumuladas favorecen el desarrollo de infecciones bacterianas broncopulmonares, que se establecen de manera crónica e inducen constantemente la respuesta inflamatoria, cuyas moléculas mediadoras estimulan a su vez una mayor producción de secreciones. Con el tiempo, este proceso produce daño tisular y una drástica disminución de la capacidad pulmonar desencadenando la falla respiratoria [47,57,67].

Tal como se mencionó anteriormente, la mucosidad espesa acumulada en las vías respiratorias de los pacientes con FQ constituye un excelente medio de cultivo para el crecimiento de múltiples patógenos microbianos. Si bien las especies patógenas involucradas pueden variar tanto en función del ambiente o de la terapia antimicrobiana administrada, está claramente establecido que la predisposición a la infección causada por determinada bacteria cambia con respecto a la edad del paciente [68]. Durante la infancia, los patógenos prevalentes son *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*, mientras que *P. aeruginosa* y *Burkholderia cepacia* son más frecuentemente aisladas en pacientes adultos [49,69-71]. Asimismo, en los últimos años se ha documentado la emergencia de nuevos patógenos bacterianos asociados a pacientes con FQ como por ejemplo *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rastolnia mannitolityca* y *Pandorea sp.*, hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Candida*, así como ciertos virus [49,69,71-73]. De esta manera, la flora

microbiana del tracto respiratorio de pacientes con FQ representa un ecosistema complejo y diverso en el cual coexisten comunidades de múltiples microorganismos [48,49,72]. Sin embargo y tal como se mencionó anteriormente, el principal patógeno es *P. aeruginosa*, observándose en el 80% de los pacientes adultos y constituyendo consecuentemente el agente etiológico más relevante y la mayor causa de morbilidad y mortalidad en estos pacientes [21-23,42-46]. En concordancia, en la República Argentina se ha reportado que el 77.4% de las infecciones crónicas en pacientes adultos con FQ son producidas por *P. aeruginosa* [74].

2.1. MICROEVOLUCIÓN DE *P. AERUGINOSA* EN INFECCIONES PULMONARES CRÓNICAS EN PACIENTES CON FQ: ESTRATEGIAS ADAPTATIVAS Y DE PERSISTENCIA.

El progreso de la infección pulmonar causada por *P. aeruginosa* tiende a seguir un patrón característico (Figura II). En los primeros años de vida, los pacientes sufren infecciones recurrentes producidas por cepas diferentes que provienen del ambiente [31,75,76]. Esta etapa infectiva se caracteriza por presentar un cuadro clínico similar a una pulmonía aguda, en el cual la invasión y diseminación de *P. aeruginosa* se produce a través de una gama de factores de virulencia que se expresan en la superficie de la bacteria y/o son secretados extracelularmente [28,31,77]. Sin embargo, las vías aéreas de los pacientes con FQ terminan indefectiblemente siendo colonizadas de manera crónica por una de estas cepas. Así, durante este estadio crónico, un único clon se establece y sobrevive a largo plazo, resistiendo al constante ataque del sistema inmune y a las distintas terapias antimicrobianas [50,51,77]. El establecimiento de la infección crónica no está basado en la expresión de los factores de virulencia característicos de infecciones agudas, sino que constituye un proceso transformativo para la bacteria en sí misma. Esta transformación es de carácter genético y está basada en procesos microevolutivos de mutación seguidos de selección en el que genes específicos son mutados con la consecuente emergencia de fenotipos altamente especializados capaces de sobrevivir y persistir durante años, e incluso décadas, sin poder ser erradicados por ninguna terapia conocida [50,77-79].

El aislamiento regular de clones bacterianos a partir de muestras de esputo obtenidas de pacientes con FQ ha permitido caracterizar el transcurso de

la infección y comprender la trayectoria evolutiva que subyace a la adaptación de *P. aeruginosa* dentro de vías respiratorias [17,78-82]. En base a estos estudios, se han propuesto tres estrategias que permitirían esta extraordinaria adaptación y persistencia: i) el crecimiento en biofilms, ii) la diversificación fenotípica y iii) la alta prevalencia de cepas hipermutadoras.

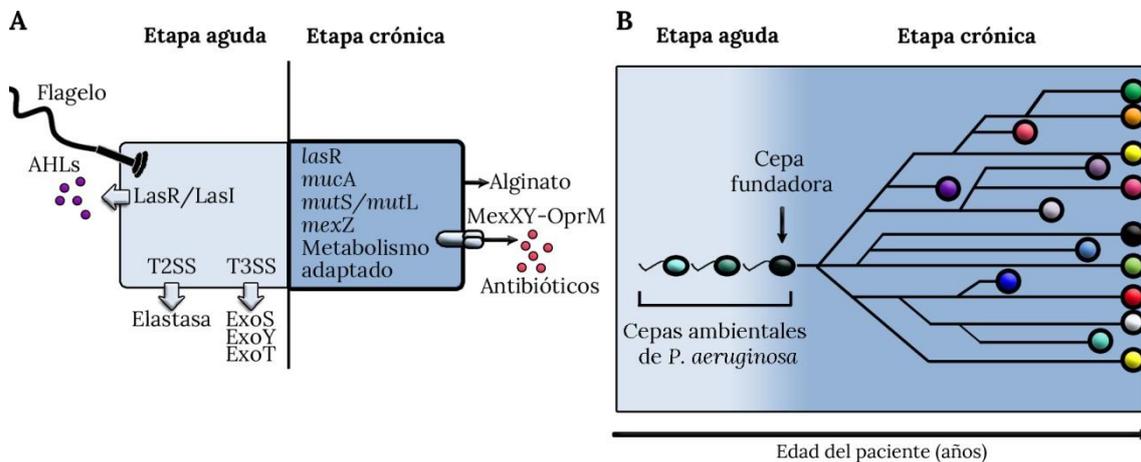


Figura II. Microevolución del patógeno oportunista *P. aeruginosa* en las vías aéreas de pacientes con FQ. (A) Transición de *P. aeruginosa* desde el patógeno infectante inicial del pulmón FQ al patógeno crónico característico de los estadios tardíos de la enfermedad. Este proceso incluye una variedad de cambios adaptativos tales como la resistencia incrementada a antibióticos (por la sobreexpresión de genes que codifican para bombas de eflujo, como MexXY, por mutaciones en *mexZ*), la conversión al fenotipo mucoso y sobreproducción de alginato (por mutaciones en *mucA*), la pérdida de factores celulares implicados en la virulencia (por mutaciones en *lasR*) y el fenotipo hipermutador, (por mutaciones en *mutS* y *mutL*). (B) Representación esquemática de la progresión de la infección causada por *P. aeruginosa* en un paciente con FQ. En los primeros años de vida, los pacientes sufren infecciones recurrentes ocasionadas por diferentes cepas de *P. aeruginosa* de origen ambiental. Durante esta etapa aguda, las infecciones pueden ser erradicadas y los pacientes pueden incluso no presentar infecciones por varios años. El proceso se repite hasta el establecimiento de la infección crónica, en la cual un clon ancestral sufre transformaciones genéticas que favorecen su persistencia. Durante la etapa crónica, la bacteria se adapta mediante mecanismos de mutación y selección generando una descendencia filogenéticamente relacionada aunque genéticamente diversa, la cual persiste en las vías aéreas a lo largo de la vida del paciente. Modificado de Nguyen y col, 2006 [79].

2.1.1. Crecimiento en biofilms.

El crecimiento en biofilms es un estilo de vida que adoptan las especies bacterianas, en el cual las células viven en una comunidad adherida a una superficie. En la clínica, las superficies que sirven como sustrato para este tipo de crecimiento son catéteres, respiradores u otro tipo de implantes médicos [24,35,83], o bien el mismo tejido vivo, como es el caso del mucus del tracto respiratorio de pacientes con FQ, en donde las bacterias crecen inmersas [84,85].

El proceso de formación de biofilms en *P. aeruginosa* ha sido ampliamente caracterizado y constituye el paradigma entre las distintas especies bacterianas [86,87]. En él se pueden identificar tres etapas principales que se desarrollan de manera secuencial: adherencia, maduración y dispersión del biofilm (Figura I2). El proceso comienza cuando las células que están en un estadio planctónico entran en contacto con la superficie (Figura I2-1). Esta etapa de adherencia es inicialmente reversible y está mediada por fuerzas inespecíficas, tales como fuerzas electrostáticas y fuerzas de Lifshitz-Van der Waals, que tienen lugar entre la superficie y los apéndices externos de la bacteria, tales como el flagelo, los pili tipo IV y las fimbrias Cup [86,88,89]. Posteriormente, la adherencia se torna irreversible, debido a que las células comienzan a sintetizar una matriz extracelular, la cual está compuesta por exopolisacáridos, tales como alginato, Pel y Psl, y proteínas tales como adhesinas [90-92]. Por lo general, las células irreversiblemente adheridas suprimen la expresión de flagelos, siendo por lo tanto inmóviles. Durante la siguiente etapa denominada maduración (Figura I2-2), las bacterias adheridas y embebidas en la matriz extracelular se dividen y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión formando una microcolonia. El biofilm continúa creciendo, de forma tal que la microcolonia se diferencia en una macrocolonia, constituyendo un biofilm maduro, el cual posee una estructura tridimensional generalmente en forma de seta [93,94]. Entre las macrocolonias existen canales, a manera de un sistema circulatorio primitivo que permiten el intercambio de nutrientes, de moléculas señales y de productos de desecho [95,96]. El último paso en el proceso de formación de biofilms involucra la dispersión de las células (Figura I2-3). La dispersión es un fenómeno activo y altamente regulado que ocurre en respuesta a determinadas señales del ambiente, [90,97-99]. El fenómeno de dispersión, puede ser desencadenado por condiciones de crecimiento desfavorables dentro del biofilm, tal como la falta de nutrientes, ofreciendo a las células la oportunidad de colonizar nuevos nichos y perpetuar la infección, iniciando un nuevo ciclo de formación de biofilms [100-103]. Este proceso requiere de la síntesis de enzimas extracelulares que degradan los componentes adhesivos de la matriz y por lo general, las células dispersas recuperan la motilidad mediada por flagelos, regresando de esta manera a un estadio planctónico [100-103].

Es importante destacar que la formación y estructuración tridimensional de los biofilms, supone la constitución de ambientes temporal y espacialmente heterogéneos. Así, la actividad metabólica de las células del biofilm resulta en un gradiente de concentración de nutrientes y productos metabólicos que genera distintos microambientes. Conforme las bacterias responden a estos cambios y gradientes se van adaptando a las condiciones estructurales y químicas locales, conllevando a un proceso de diversificación fenotípica o radiación adaptativa (ver sección siguiente) [78,81,104]. Cabe destacar que este proceso de diversificación está basado en eventos mutagénicos, por lo que igualmente implica una adaptación genética [78,81]. Por su lado, las células que se dispersan del biofilm readquieren las propiedades fenotípicas y metabólicas distintivas características de las células planctónicas [98,101-103]. Por lo tanto, la dinámica de formación de biofilms representa un ciclo de adaptación que involucra la generación de variantes genéticamente diversas dentro de la comunidad del biofilm y la subsiguiente readaptación a la vida planctónica en la etapa de dispersión.

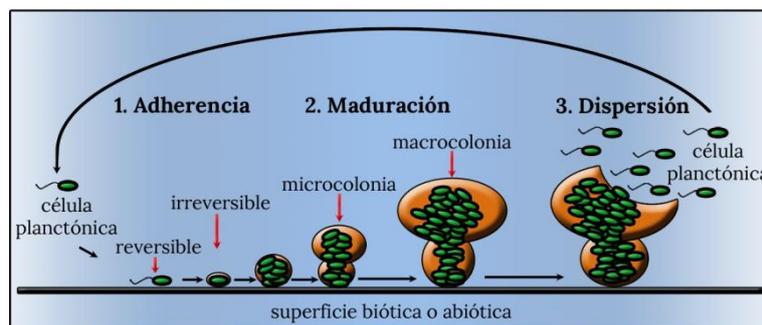


Figura I2. Modelo propuesto para el ciclo de formación de biofilms de *P. aeruginosa* en condiciones *in vitro*. (1) El proceso comienza cuando las células en un estadio planctónico se adhieren a una superficie biótica o abiótica. Inicialmente, esta adhesión es reversible y está mediada por interacciones electroestáticas entre la superficie y apéndices bacterianos tales como flagelos, fimbrias Cup y pili tipo IV. Posteriormente, las bacterias comienzan a sintetizar la matriz extracelular compuesta por exopolisacáridos y adhesinas, por lo que la adhesión se torna irreversible. En esta instancia, las células adheridas son inmóviles. (2) La siguiente etapa se denomina maduración, en la cual el crecimiento de las células permite la formación de una microcolonia, cuyo desarrollo lleva posteriormente a obtención de las macrocolonias características del biofilm maduro. (3) Por último se produce la dispersión y desprendimiento de las bacterias, las cuales pasan nuevamente a un estadio planctónico y son capaces de colonizar una nueva superficie, recomenzando de esta manera un nuevo ciclo de formación de biofilms. Esquema modificado de McDaniel y col, 2015 [105].

Es importante destacar que, en el contexto de una infección, la estructura del biofilm brinda protección contra el sistema inmunológico del hospedador y al mismo tiempo, incrementa la tolerancia a distintos antibióticos [106,107]. Muchos

factores propios de la estructura del biofilm favorecen esta resistencia, incluyendo la penetración restringida de las drogas relacionada a la presencia de la matriz de exopolisacáridos y el crecimiento lento de las bacterias que conforman la comunidad, debido a una concentración de nutrientes y presión de oxígeno limitantes [108]. Por otro lado, se ha postulado que el proceso de dispersión, estaría asociado a eventos de exacerbación de las infecciones que sufren estos pacientes durante el proceso infeccioso crónico [101,109,110]. Por lo tanto, desde un punto de vista clínico, el ciclo de formación de biofilms de la bacteria representa una importante estrategia que favorece la persistencia en el pulmón FQ [85,111].

2.1.2. Diversificación fenotípica.

Tal como se describió anteriormente, las infecciones pulmonares en pacientes con FQ se establecen como crónicas a partir de una única cepa de *P. aeruginosa* proveniente del ambiente, la cual sufre un proceso adaptativo a nivel genético que conlleva a un proceso de diversificación fenotípica o radiación adaptativa [78,81,104]. Este proceso implica una sucesión de eventos de ocurrencia y selección de mutaciones que resultan beneficiosas para el crecimiento y supervivencia en el pulmón FQ (Figura I3-A). La diversificación fenotípica está relacionada así, a la complejidad espacio-temporal existente en las vías aéreas y a la heterogeneidad observada durante el crecimiento en biofilms de *P. aeruginosa* en este ambiente. El resultado es la emergencia de sub-poblaciones de *P. aeruginosa* clonalmente relacionadas y que han adquirido mutaciones que brindan una adaptación metabólica, la atenuación de la virulencia, la resistencia a antibióticos, un incremento en la tasa de mutación y/o una mayor capacidad de formación de biofilms [76,78,81]. Este proceso es fácilmente visualizado al analizar las morfologías de colonias que adoptan las bacterias cuando crecen en medios de cultivos sólidos (Figura I3-B).

La diversificación fenotípica es claramente estratégica y resulta beneficiosa para toda la población infectante, pues cada variante posee habilidades distintivas que le permiten enfrentar condiciones ambientales diferentes [81]. Este proceso, aunque no idéntico, sigue un patrón característico, ya que aislados de *P. aeruginosa* obtenidos de diferentes pacientes con FQ presentan frecuentemente mutaciones en los mismos genes, de forma tal que dan lugar a fenotipos comunes

que han sido fuertemente asociados a la cronicidad de la infección. Esta última observación sugiere la existencia de una evolución paralela de *P. aeruginosa* en las vías aéreas de los pacientes con FQ [17,81,112]. Entre las variantes fenotípicas frecuentemente observadas en aislados de *P. aeruginosa* obtenidas a partir de infecciones crónicas en pacientes con FQ se pueden destacar: las variantes mucosas, caracterizadas por la sobreproducción de alginato a consecuencia de mutaciones en el gen *mucA* [113], variantes hipermutadoras, caracterizadas por presentar una elevada tasa de mutación debido a la pérdida de función de los sistemas de reparación por mutaciones en los genes *mutS* y *mutL* [16], variantes resistentes a antibióticos, debido a mutaciones en genes relacionados tales como *mexZ*, *mexR* y *mexT* [114], variantes deficientes en el *Quorum Sensing* (QS), principalmente por mutaciones en el gen *lasR* [115], variantes que poseen afectados la motilidad, la producción de sideróforos (variantes pigmentadas), variantes auxotróficas y autolíticas, entre otras [78,81]. Asimismo, cabe destacar a las variantes de colonias pequeñas o SCV (por sus siglas del inglés, *Small Colony Variants*), las cuales se caracterizan por ser hiperformadoras de biofilms y representan uno de los aspectos de estudio centrales de este trabajo de tesis.

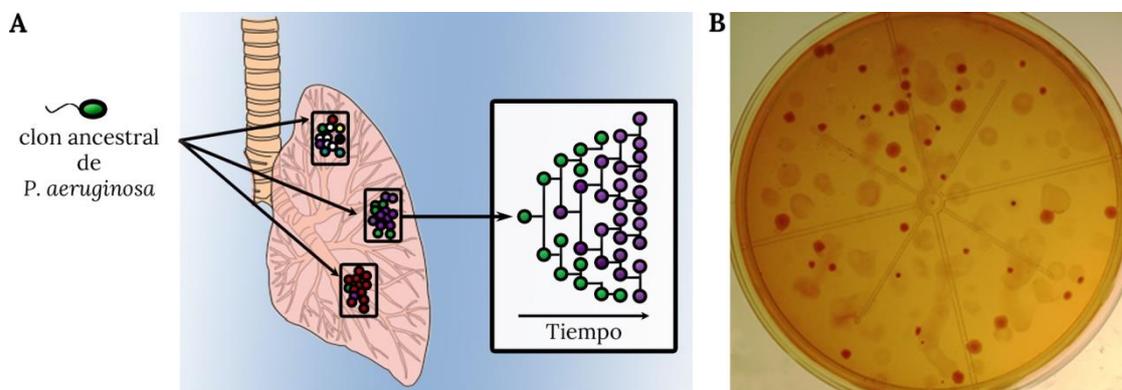


Figura I3. Diversificación fenotípica observada en infecciones pulmonares crónicas producidas por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ. A) Una cepa ancestral de *P. aeruginosa* proveniente del ambiente es capaz de establecerse generando una infección crónica. Conforme la infección progresa, *P. aeruginosa* coloniza diferentes nichos ecológicos del pulmón FQ. La heterogeneidad producida por el crecimiento en biofilms en conjunto con la complejidad de microambientes que representan las vías aéreas, promueve la diversificación en sublinajes diferencialmente adaptados. El proceso de diversificación está basado en eventos de emergencia y posterior selección de clones que albergan mutaciones adaptativas, por lo que la frecuencia de dichos clones se incrementa en la población en función del tiempo (el detalle ejemplifica con un círculo violeta un clon que posee una mutación adaptativa). Modificado de Didelot y col, 2016 [116]. B) Muestra de esputo de un paciente con FQ sembrada en medios de cultivo sólidos específicos para el crecimiento de *P. aeruginosa*. Las variantes fenotípicas de *P. aeruginosa* coexisten en las vías aéreas FQ y pueden ser evidenciadas por las diferencias en cuanto a su morfología de colonias.

2.1.2.1. Las variantes de colonias pequeñas (SCV) de *P. aeruginosa*.

Tal como se detalló en la sección anterior, *P. aeruginosa* se adapta al crecimiento en el ambiente heterogéneo del biofilm y de las vías aéreas del pulmón FQ a través de la generación de una descendencia genotípica y fenotípicamente diversa, dentro de la cual aquellas variantes más aptas son posteriormente seleccionadas por el ambiente favoreciendo su propagación en las generaciones siguientes. Entre ellas, las SCV incluyen un grupo de variantes morfológicas cuyas colonias se caracterizan por tener un diámetro comprendido entre 1 a 3 mm y un aspecto generalmente rugoso (Figura I4-B). En términos generales, las SCV exhiben un comportamiento hiperadherente, son hiperpiliadas y poseen una capacidad de síntesis de los exopolisacáridos Pel y Psl incrementada, propiedades por las cuales son hiperformadoras de biofilms [117-119]. Estas variantes no muestran, a su vez, el movimiento mediado por flagelos o *swarming* [118,120], mientras que el movimiento mediado por pili o *twitching* se encuentra incrementado [117]. Estas características contrastan con la morfología de colonias típica de *P. aeruginosa* (Figura I4-A), las cuales poseen un diámetro comprendido entre 4-6 mm, con bordes netos y un aspecto liso asociado con la presencia de motilidad tipo *swarming* [121]. Es importante aclarar que el fenotipo SCV está directamente asociado a la capacidad que posee esta bacteria de crecer en cultivos en biofilms, por lo tanto su emergencia ha sido reportada en un contexto clínico *in vivo* así como en cultivos en biofilms obtenidos en el laboratorio.

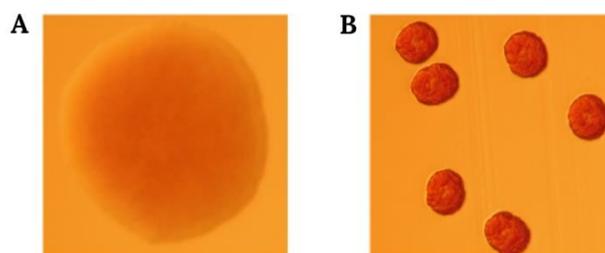


Figura 14. El fenotipo SCV de *P. aeruginosa*. Colonias de una cepa silvestre (A) y variantes SCV (B) crecidas en un medio de cultivo suplementado con rojo Congo. Este colorante se adhiere a los exopolisacáridos Pel y Psl, de tal forma que cuanto mayor sea la producción de exopolisacáridos la colonia adquiere una coloración roja intensa. Extraído de Malone y col, 2010 [122].

Si bien las SCV han sido descritas décadas atrás [123,124], la base molecular que subyace a la adquisición de esta morfología aún no ha sido totalmente definida. La emergencia del fenotipo SCV de *P. aeruginosa* ha sido

relacionada al crecimiento en concentraciones inhibitorias de kanamicina (mutaciones en el gen *pvrS*) [125], se ha descrito la contribución del segundo mensajero c-di-GMP (mutaciones en los genes *wspF* e *yfiBNR*) [122,126], la participación de las fimbrias CupA [127] y de los exopolisacáridos Pel y Psl [118], la implicancia del bacteriófago filamentoso pf4 [128,129]. En otras especies patógenas, como por ejemplo en *S. aureus*, se ha demostrado la participación de grandes rearrreglos genéticos, tales como inversiones del ADN, en la conversión al fenotipo SCV [130].

Desde un punto de vista clínico, en los últimos años, se ha establecido una correlación directa entre la emergencia de variantes SCV y un pronóstico desfavorable para el pacientes con FQ, determinado por una función pulmonar disminuida, menor oxígeno en sangre, menor volumen espiratorio forzado (VEP)¹ y una notable disminución en el peso corporal [117,131]. En este mismo sentido, en modelos animales *in vivo*, el morfotipo SCV se correlaciona con una mayor persistencia de la infección por *P. aeruginosa* [122,132,133].

Es importante mencionar, que cuando las variantes SCV obtenidas a partir de pacientes con FQ son crecidas *in vitro*, un porcentaje variable de clones sufre un fenómeno de reversión espontánea mediante el cual se pierden sus propiedades fenotípicas distintivas y se readquieren las propias de las cepas silvestres [117]. De esta manera, los procesos de emergencia y reversión del fenotipo SCV se corresponden a los estadios de formación y dispersión de cultivos en biofilms. Asimismo, la base molecular que subyace a la reversión SCV no ha sido hasta el momento elucidada.

2.1.3. Hipermutabilidad en FQ.

Una característica distintiva de las infecciones pulmonares crónicas causadas por *P. aeruginosa* es la alta prevalencia de cepas que muestran una tasa de mutación espontánea incrementada. Estas cepas, denominadas hipermutadoras, han sido identificadas en una proporción entre el 16-36% en

¹ Corresponde a la cantidad de aire expulsado durante el primer segundo de la espiración máxima, realizada tras una inspiración máxima. Es una prueba de rutina que se utiliza para evaluar la condición clínica en pacientes con FQ.

infecciones crónicas, [15,16,134-137] mientras que en infecciones agudas, así como en aislados ambientales, son raramente documentadas. Notablemente, la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* hipermutadoras aisladas de pacientes con FQ son deficientes en el Sistema de Reparación de Bases Apareadas Incorrectamente (MRS, por sus siglas del inglés *Mismatch Repair System*), principalmente por alteraciones en los genes *mutS* y *mutL* (ver más adelante) [16,17,80,137].

La emergencia de cepas hipermutadoras ha sido relacionada con su posible contribución en la adaptación al ambiente FQ, fundamentalmente por su asociación con la resistencia a antibióticos [134,137-140]. Sin embargo, la resistencia a antibióticos es un fenómeno intrínsecamente asociado a *P. aeruginosa*, por lo que se manifiesta igualmente en infecciones agudas [137,141,142], donde la prevalencia de cepas hipermutadoras es muy baja. Más aún, la alta frecuencia de cepas de *P. aeruginosa* hipermutadoras se ha descrito en otros procesos pulmonares crónicos diferentes a FQ, tales como la bronquiectasia y la EPOC [143,144]. Asimismo, en este tipo particular de infecciones, se ha reportado la emergencia de cepas hipermutadoras de especies diferentes a *P. aeruginosa*, tales como *S. aureus* [19], *H. influenzae* [69], *B. cepacia* [18], entre otras. Estas observaciones indican una clara asociación entre hipermutabilidad y cronicidad de la infección, sugiriendo que la ventaja adaptativa de la emergencia del fenotipo hipermutador estaría relacionada a las distintas estrategias desplegadas por la bacteria para su persistencia. En este sentido, las distintas investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio indican que la alta prevalencia de cepas hipermutadoras en aislados obtenidos de infecciones crónicas estaría relacionada a una mayor emergencia de fenotipos adaptados y una diversificación genética y fenotípica incrementada, fundamentalmente en biofilms (ver más adelante) [17,80,145-149]. De esta manera, la hipermutabilidad podría acelerar la adaptación frente a las situaciones de estrés generadas en el pulmón durante el transcurso de la infección y sería co-seleccionada con aquellas mutaciones beneficiosas a las que dio origen, en base al mecanismo denominado *hitchhiking* [6]. Si bien, esta hipótesis está generalmente aceptada, hasta el momento no se ha encontrado una correlación clara entre hipermutabilidad y la emergencia de algún fenotipo específico que conlleve a la adaptación durante el establecimiento de las infecciones pulmonares crónicas en pacientes con FQ (ver más adelante) [17,80].

2.1.3.1. Hipermutabilidad estable por deficiencia en el sistema de corrección de bases apareadas incorrectamente (MRS).

La hipermutabilidad estable hace referencia al incremento en la tasa de mutación debido a alteraciones permanentes en la célula, las cuales son a su vez heredables a las población subsiguiente [6-8]. Por lo general, es el resultado de alteraciones genéticas que producen la pérdida de función de sistemas encargados de la prevención y/o reparación de mutaciones u otras lesiones en el ADN [11]. Entre ellos, la deficiencia MRS producida por la inactivación de alguno de sus componentes, es la más frecuentemente observada en poblaciones bacterianas [13,14,150].

El MRS es un sistema multienzimático que repara errores cometidos durante la replicación del ADN y que escapan a la actividad correctora o “*proofreading*” de la ADN polimerasa, por lo que su actividad es post-replicativa [151,152]. Asimismo, las proteínas del MRS reconocen bases apareadas incorrectamente en secuencias del heterodúplex que intermedia el proceso de recombinación [152,153]. Así, el MRS, a la vez que confiere mayor fidelidad al proceso replicativo, evita la recombinación entre secuencias de ADN parcialmente homólogas (recombinación homeóloga), ya sea presentes en un mismo genoma o que provienen de organismos diferentes [152,154,155]. Por lo tanto, la actividad reparadora post-replicativa así como la función antirecombinatoria del MRS propician la estabilidad genómica y la integridad general del material genético, por lo que los aspectos funcionales básicos de este sistema han sido conservados a lo largo de la evolución [152,155].

Como se detalla en la Figura 15, el mecanismo general que permite la corrección de errores por el MRS se basa en el reconocimiento de distorsiones en la doble hélice (apareamientos incorrectos), el reclutamiento de las proteínas que conforman al sistema de reparación, y la remoción y posterior resíntesis de la secuencia que contiene a la base mal incorporada en la hebra recién sintetizada. Para este proceso, se requieren de las proteínas específicas Mut, las cuales se encuentran conservadas en bacterias e incluso en organismos superiores [151-153,156]. Los desapareamientos en la secuencia de ADN resultan de la incorporación de nucleótidos incorrectos por la ADN polimerasa, o de la no incorporación de un nucleótido por patinado de la misma, lo cual genera distorsiones en la estructura de la doble hebra [151,152]. Esta distorsión es

reconocida por la proteína MutS (Figura I5-1), la cual al unirse a las bases mal apareadas, induce la unión de forma sucesiva del resto de los componentes del MRS (Figura I5-2), lo cual permite la digestión de la hebra nueva que incluye el error (Figura I5-3) [151,152]. Posteriormente, la ADN polimerasa III se encarga de la resíntesis la base correcta y la ADN ligasa del ligado que restablece el enlace fosfodiéster de la cadena reparada (Figura I5-4). El proceso de reparación requiere de un mecanismo de discriminación de hebras del ADN, en cuya ausencia, un error replicativo tendría las mismas posibilidades de ser utilizado como templado para la corrección o fijarse como mutación [152]. Particularmente, en *E. coli*, el sistema de discriminación de hebras es dependiente del estado de metilación del ADN [156], mientras que en células eucariotas se produce a través de la presencia de cortes o “nicks” en la hebra recién sintetizada [153]. En el caso de *P. aeruginosa*, el mecanismo de discriminación de hebras implicado en la reparación no ha sido determinado hasta el momento.

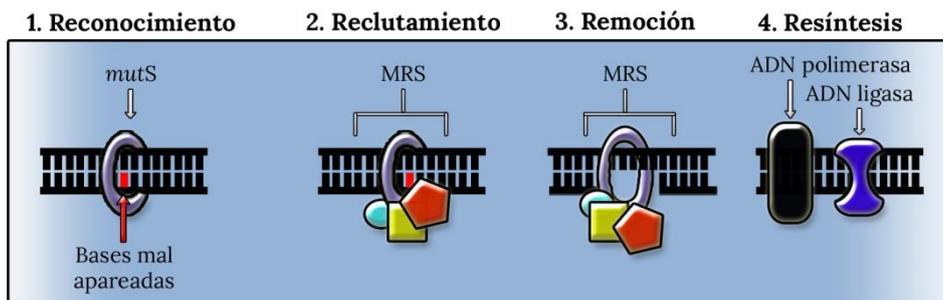


Figura I5. Sistema de reparación de Bases Apareadas Incorrectamente (MRS). El esquema muestra el mecanismo de reparación de los errores que escapan a la actividad “proofreading” de la ADN polimerasa por el MRS. El par de bases apareado de forma incorrecta es reconocido por MutS (1). Posteriormente, el complejo constituido por el ADN y MutS interacciona con MutL y recluta al resto de los componentes del MRS (2), produciendo un corte en la hebra recién sintetizada y remoción de la secuencia que contiene al par de bases mal apareados (3). Posteriormente, se produce la resíntesis y ligado de la nueva hebra por parte de la ADN polimerasa III y la ADN ligasa (4).

De acuerdo al mecanismo de acción del MRS, cualquier mutación o alteración que afecte el normal funcionamiento de alguna de sus proteínas, afectará la actividad correctora de todo el sistema, conllevando a la acumulación de mutaciones y la consecuente hipermutabilidad. Así, una bacteria mutante para los genes *mut* posee una tasa de mutación incrementada entre 100 y 1000 veces [150-152,156-158]. Dado que la deficiencia en el MRS es debida a mutaciones en alguno de sus componentes, la hipermutabilidad es heredable y estable a lo largo

de las generaciones. Es importante mencionar que en organismos superiores se ha determinado la presencia de genes homólogos a *mutS* y *mutL* de procariotas, y su deficiencia en el hombre ha sido asociada a una mayor propensión al cáncer [158].

3. INTERRELACIÓN ENTRE EL PROCESO DE FORMACIÓN DE BIOFILMS, LA DIVERSIFICACIÓN FENOTÍPICA Y LA HIPERMUTABILIDAD ESTABLE EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Tal como se mencionó en las secciones anteriores, *P. aeruginosa* persiste en el pulmón de pacientes con FQ debido al desarrollo de tres estrategias adaptativas: la capacidad de crecer en biofilms, la diversificación fenotípica y el incremento en la tasa de mutación. En principio, la diversificación fenotípica se produce como consecuencia del crecimiento de *P. aeruginosa* en biofilms, en los cuales el ambiente heterogéneo que se genera a partir de factores estructurales y gradientes químicos, modela la presencia de microambientes específicos [78,81,104]. Esta heterogeneidad ambiental promueve un proceso de adaptación genética y la emergencia de variantes genotípicamente diversas, dentro de las cuales, aquellos fenotipos beneficiosos serán posteriormente seleccionados [78,81,104]. Debido a que esta diversificación está basada en la ocurrencia de mutaciones, es posible plantear que la hipermutabilidad favorecería el proceso, afectando a su vez al ciclo de formación de biofilms.

En este sentido, investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio han aportado importantes evidencias que demuestran la interrelación existente entre las tres estrategias desplegadas por *P. aeruginosa*. Así, nuestros resultados confirman que la hipermutabilidad genera una mayor diversificación fenotípica en cultivos en biofilms realizados *in vitro*, observándose, con respecto a cepas normomutadoras, un número de morfotipos mayor y una mayor frecuencia de emergencia de cada uno de ellos [146]. Asimismo, se observó que cepas de *P. aeruginosa* deficientes en el MRS mostraban un desarrollo acelerado del biofilm a través de la formación de microcolonias de mayor tamaño y fenómenos de dispersión anticipadas [146]. Más aún, se observó que la deficiencia en el MRS otorga una ventaja competitiva con respecto a cepas normomutadoras durante el crecimiento en biofilms mixtos, y se demostró que esta ventaja está relacionada con su mayor capacidad de generar variantes fenotípicamente diversas que resultan beneficiosas para el crecimiento en este ambiente particular [146]. Por

otro lado, se estableció *in vitro* una correlación entre hipermutabilidad y la emergencia de fenotipos característicos y frecuentemente aislados a partir de infecciones pulmonares crónicas en pacientes con FQ. Particularmente, estudiando el fenotipo mucoso (mutantes en el gen *mucA*) y el fenotipo deficiente en el QS (mutantes en el gen *lasR*) se logró determinar que la frecuencia de emergencia de estos fenotipos fue notablemente mayor en cepas hipermutadoras por deficiencia en el MRS [147-149]. Sin embargo, esta correlación no pudo ser establecida en condiciones *in vivo* a partir del estudio de cepas de *P. aeruginosa* obtenidos de muestras de esputo recolectadas de pacientes con FQ [80]. En este sentido, se determinó que las cepas mucosas, al igual que las variantes deficientes en el QS, se distribuyen en estas colecciones de manera independiente a la deficiencia del MRS [80]. A partir de un análisis global del impacto de la hipermutabilidad sobre la evolución genómica de poblaciones de *P. aeruginosa* que coexisten en un mismo paciente con FQ, indicó que la deficiencia en el MRS tendría un efecto general en el proceso de adaptación al ambiente FQ, favoreciendo la diversificación genética sin estar asociada a ningún fenotipo en particular [17].

3.1. HIPERMUTABILIDAD Y CONVERSIÓN AL FENOTIPO MUCOSO EN *P. AERUGINOSA*.

Tal como se mencionó anteriormente, parte de nuestras investigaciones estuvieron dirigidas a establecer la asociación entre hipermutabilidad y el fenómeno de conversión al fenotipo mucoso en *P. aeruginosa*. Particularmente, la conversión al fenotipo mucoso se produce a consecuencia de la sobreexpresión del exopolisacárido alginato, cuya síntesis ocurre a partir del operón biosintético conformado por los genes *algD*,*8*,*44*,*KEGXLIJFA* [159]. La producción de alginato depende principalmente del factor sigma alternativo σ_{22} , codificado por el gen *algT*, quien regula positivamente al operón biosintético, mediante su unión a la región promotora de *algD* [159,160]. Al mismo tiempo, la síntesis de alginato está controlada por la proteína de membrana MucA, la cual cumple el rol de regular negativamente la síntesis de alginato al secuestrar a AlgT y reprimir su actividad [161]. Los reguladores AlgT y MucA se expresan a partir del operón *algT-mucABCD* [162,163]. Por su lado, los genes *mucB* y *mucD* codifican también para proteínas que regulan negativamente la síntesis de alginato, ya que de manera directa o indirecta

estabilizan a MucA [161,164-166]. Por lo tanto, mutaciones que producen pérdida de función de los genes *muc* conllevan a una desregulación de AlgT y como resultado originan la sobreproducción de alginato con la consecuente conversión al fenotipo mucoso.

Se ha descrito que durante las infecciones pulmonares en pacientes con FQ, la vía más frecuente de conversión al fenotipo mucoso es a través de mutaciones en el gen *mucA*, las que en su mayoría producen versiones truncas de esta proteína [167,168]. En este contexto, mediante estudios genéticos realizados *in vitro*, en nuestro laboratorio demostramos que la mayoría de las variantes mucosas de *P. aeruginosa* aisladas poseían mutaciones en el gen *mucA*, pero la naturaleza y la distribución de tales mutaciones fueron muy diferentes en cepas deficientes en el MRS con respecto a cepas normomutadoras [148]. Mientras que para estas últimas, las colonias mucosas obtenidas mostraron una gran diversidad en cuanto al tipo de mutaciones en *mucA*, la mayoría de las colonias mucosas derivadas de la cepa hipermutadora presentaron una delección -1 pb en una repetición homoplímica (SSR, por sus siglas del inglés *Simple Sequence Repeat*) de 5 guaninas que se ubica en la posición 426 de este gen (G^5SSR_{426}) [148]. Asimismo, se observó que la ocurrencia de esta mutación era dependiente de la acción de la ADN polimerasa IV (Pol IV) [148], una polimerasa propensa a cometer errores y que, a través de la respuesta SOS, produce estados de hipermutabilidad transiente o inducida por condiciones de estrés [169,170]. De hecho, se determinó que la acción de esta polimerasa, particularmente introduciendo delecciones -1 pb en G^5SSR_{426} , en combinación con su falta de corrección por deficiencia en el MRS, produciría un significativo aumento de la frecuencia de mutagénesis del gen *mucA*, sesgando la vía genética mediante la cual la bacteria se convierte al fenotipo mucoso. Esta observación fue confirmada mediante la remoción del G^5SSR_{426} por mutagénesis sitio dirigida en cepas deficientes en el MRS. En ellas se observó que las vías de conversión al fenotipo mucoso eran totalmente independientes del gen *mucA*, al mismo tiempo que la frecuencia de conversión fue drásticamente menor [147]. Claramente, estos resultados demuestran como distintos factores que controlan la tasa de mutación (MutS, Pol IV y el G^5SSR_{426}) afectan la conversión a un fenotipo clave en términos adaptativos y de patogénesis, no sólo a nivel cuantitativo sino también a nivel cualitativo, sesgando la mutagénesis a determinados genes en relación a otros que podrían por redundancia, conllevar a

características fenotípicas similares [147,148]. Cabe entre otros resultados destacar, que la inestabilidad del fenotipo mucoso en condiciones *in vitro* fue evidenciada por la reversión de las propiedades fenotípicas y la pérdida del aspecto mucoso de la colonia [148]. Se determinó que la frecuencia a la cual las colonias mucosas revierten, fue notablemente mayor en cepas hipermutadoras, indicando igualmente la participación de un mecanismo basado en mutaciones [148]. Cabe destacar que a nivel molecular, este proceso de reversión, aunque podría ocurrir por reversión directa de la mutación ocurrida en *mucA*, se ha descrito que ocurre por mutaciones compensatorias en el gen *algT* [161,171,172].

La redundancia de vías génicas implicadas en el proceso de conversión al fenotipo mucoso y la presencia de posibles vías que facilitan el proceso de reversión a una morfología típica de colonias, en conjunto con las evidencias que indican que la hipermutabilidad por deficiencia en el MRS incrementa la frecuencia de ambos procesos, abren nuevas preguntas en relación al potencial genético de *P. aeruginosa* para la conversión y reversión a fenotipos adaptativos de manera sucesiva. Así, uno de los principales interrogantes que motivaron el desarrollo de esta tesis doctoral, fue determinar cuál es la capacidad o flexibilidad genética que *P. aeruginosa* posee para obtener aquellas mutaciones que conllevan a la adquisición de fenotipos adaptativos de manera repetida y sucesiva, proceso que la bacteria sufre naturalmente en el ciclo de formación y dispersión de biofilms durante el transcurso de las infecciones pulmonares crónicas en pacientes con FQ. En este sentido y como se describió anteriormente, la formación de biofilms es un proceso dinámico, el cual se inicia con la adherencia de células planctónicas a una superficie. Seguidamente, el crecimiento y formación de la comunidad del biofilm favorece la emergencia o conversión a una variedad de fenotipos adaptativos. Finalmente, durante la dispersión desde el biofilm, se observa una reversión de las propiedades fenotípicas de estas variantes al estadio de vida planctónico, permitiendo así reiniciar el ciclo y propagar la infección en el pulmón. De esta manera, en los procesos de formación y dispersión del biofilm, se producen consecutivamente eventos de conversión y reversión de los fenotipos a él adaptados, basados en todos los casos en eventos mutacionales. Es importante recordar que *P. aeruginosa* posee uno de los genomas más grandes dentro del reino de las bacterias, con un gran número de genes y reguladores globales [52,53]. En este sentido y en un marco teórico, la bacteria podría implementar un camino

compensatorio para la conversión y reversión a un fenotipo adaptativo, mediante la adquisición de mutaciones en vías génicas redundantes, o bien, podría utilizar mecanismos de conversión y reversión de una misma mutación (“*switch on/off mutations*”) como aquellos en los que se basan los eventos de variación de fase en patógenos bacterianos estrictos [173-175]. En cualquier caso y por lo expuesto anteriormente, un incremento de la tasa de mutación podría resultar beneficioso en estos procesos. De esta manera, el estudio del mecanismo de conversión a morfotipos adaptados al crecimiento en biofilms, y su subsiguiente reversión, en un modelo comparativo entre cepas normomutadoras e hipermutadoras deficientes en el MRS, abre la posibilidad de avanzar en el entendimiento de la interrelación existente entre las estrategias adaptativas que despliega *P. aeruginosa* como base de su extraordinaria versatilidad para favorecer su persistencia en el pulmón FQ.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

El presente trabajo se encuentra enmarcado en un proyecto general abocado al estudio de los sistemas o factores encargados del control de la tasa de mutación y su implicancia en la adaptabilidad de la bacteria patógena oportunista *Pseudomonas aeruginosa*. En infecciones pulmonares crónicas, como en el caso de las producidas en pacientes con FQ, *P. aeruginosa* sufre un proceso de diversificación fenotípica, el cual está basado en la adquisición de mutaciones en genes puntuales y la posterior selección de los fenotipos adaptados. Este mecanismo de diversificación está directamente relacionado con el crecimiento en biofilms y favorece la persistencia de la bacteria en estos pacientes. Como parte de este proceso de diversificación, mutaciones que inactivan el MRS son frecuentemente seleccionadas, generando fenotipos hipermutadores. En el transcurso de nuestras investigaciones hemos realizado aportes que indican que la hipermutabilidad favorecería el proceso de diversificación fenotípica y consecuentemente aceleraría el desarrollo y el crecimiento de la bacteria en biofilms. De esta forma, el crecimiento en biofilms, la diversificación fenotípica y la hipermutabilidad, constituirían estrategias claves e íntimamente relacionadas para la adaptación y supervivencia de *P. aeruginosa* en los procesos infecciosos crónicos.

De acuerdo a estos antecedentes, el presente trabajo se focalizó en el estudio del mecanismo de conversión y reversión al fenotipo SCV, uno de los morfotipos característicos del crecimiento en biofilms y que emergen durante los procesos de infección crónica en pacientes con FQ. El interés por el estudio de este morfotipo en particular radica en que mientras las SCV emergen y son seleccionadas cuando la bacteria se desarrolla y crece en cultivos en biofilms, las variantes revertidas están relacionadas con el fenómeno de dispersión del biofilm, el cual permite la propagación de la infección y es fundamental para perpetuar el ciclo. En el contexto de las infecciones pulmonares crónicas, la dinámica de la formación y dispersión de biofilms supone que los fenómenos de conversión y reversión de los morfotipos especialistas se den en forma cíclica y a través de mecanismos mutagénicos. Dado que, estas infecciones se establecen a partir de un

único clon, es un ancestro común el que sufre el proceso de diversificación genética durante la formación de los biofilms y las consecutivas dispersiones para volver a colonizar nuevos espacios. En base a estas premisas, el principal objetivo de esta tesis doctoral fue determinar la capacidad o flexibilidad genética de *P. aeruginosa* y las bases moleculares implicadas en los procesos de conversión y reversión al fenotipo SCV en forma repetida y sucesiva. Al mismo tiempo, fue de interés determinar la implicancia de un incremento en la tasa de mutación, dado por deficiencia en el MRS, en estos procesos.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar el proceso de conversión y reversión al fenotipo SCV de manera comparativa entre cepas normomutadoras e hipermutadoras de *P. aeruginosa*, a través del análisis de las propiedades fenotípicas de las variantes SCV y las variantes revertidas, la determinación de las frecuencias de conversión y de reversión y el análisis de su competitividad en cultivos en biofilms.
- 2) Estudiar la flexibilidad genética de cepas normomutadoras e hipermutadoras de *P. aeruginosa* cuando son expuestas a ciclos sucesivos de conversión y reversión al fenotipo SCV, mediante ensayos evolutivos “*in vitro*”.
- 3) Analizar la base molecular implicada en los ensayos evolutivos de conversión y reversión al fenotipo SCV mediante estudios genómico-estructurales realizados a través del secuenciamiento de genomas completos de cepas de *P. aeruginosa* evolucionadas en relación a sus respectivos ancestros.

RESULTADOS

CAPÍTULO I. ESTUDIO COMPARATIVO DEL PROCESO DE CONVERSIÓN Y REVERSIÓN AL FENOTIPO SCV EN CEPAS NORMOMUTADORAS E HIPERMUTADORAS DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

Tal como se detalló anteriormente, durante el establecimiento de las infecciones pulmonares crónicas en pacientes con FQ, *P. aeruginosa* persiste en las vías aéreas mediante ciclos de formación y dispersión de biofilms. En este sentido, la heterogeneidad de microambientes que se forman durante el crecimiento en biofilms favorece un proceso de diversificación genética, permitiendo la emergencia de fenotipos adaptativos [78,81]. Entre ellos, la emergencia del fenotipo SCV, caracterizado por ser hiperformador de biofilms [117-119] y el fenotipo hipermutador, postulado como un “catalizador” de este proceso adaptativo [16,134,138], han sido ampliamente descriptos. Con el objetivo de aproximarnos en una primera instancia al estudio de la capacidad diversificadora de *P. aeruginosa* y la implicancia de la hipermutabilidad, en una primera etapa se investigó el fenómeno de conversión y reversión al fenotipo SCV a modo comparativo entre cepas normomutadoras e hipermutadoras. Para ello, primeramente, se procedió a realizar una caracterización de las propiedades fenotípicas y de competitividad tanto de las SCV como de sus variantes revertidas en cepas normomutadoras e hipermutadoras, con el interés de responder los siguientes interrogantes: i) ¿cuáles son las características distintivas del fenotipo SCV con respecto a las variantes silvestres y a las cepas revertidas?; ii) estas propiedades fenotípicas, ¿son diferentes cuando se comparan variantes obtenidas a partir de cepas normomutadoras e hipermutadoras?, iii) ¿la hipermutabilidad afecta las frecuencias de conversión y de reversión del fenotipo SCV?; iv) las SCV ¿poseen una ventaja adaptativa en biofilms?; v) ¿existen diferencias en la competitividad cuando se analiza células con una tasa de mutación diferente?. Los resultados obtenidos que intentan responder estas preguntas se detallan en el presente Capítulo.

1.1. Caracterización de variantes SCV y variantes revertidas obtenidas a partir de cepas de *P. aeruginosa* normomutadoras e hipermutadoras.

Para comenzar, se establecieron las condiciones experimentales de un modelo *in vitro* que permitieran el estudio del fenómeno de conversión y reversión al fenotipo SCV. Para ello, se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 WT normomutadora y su isogénica hipermutadora deficiente en el gen *mutS* [176], las cuales poseen una morfología de colonias típica (Figura R1-i). Para evaluar el proceso de conversión SCV, estas cepas fueron crecidas en cultivos estáticos en multiplacas, permitiendo que las bacterias se desarrollen en biofilms adheridos a la pared de los pocillos. El análisis de dichos biofilms evidenció el fenómeno de diversificación fenotípica característico previamente descrito, siendo el fenotipo SCV uno de los morfotipos frecuentemente observados (Figura R1-ii). Para evaluar el fenómeno de reversión, las SCV fueron aisladas y crecidas en placas con medios sólidos, en donde las células revertidas se desarrollan a modo de prolongaciones que se extendían desde los bordes de las colonias (Figura R1-iii). A partir de estas zonas de reversión, se aislaron las variantes revertidas que evidenciaron una morfología típica y similar al parental (Figura R1-iv). Es importante mencionar que tanto las SCV como sus variantes revertidas fueron relativamente estables, ya que mantuvieron sus características morfotípicas luego de por lo menos 3 pasajes en medio líquido, indicando que las mismas estarían basadas en cambios genéticos.

Tal como se describió previamente, el fenotipo SCV además de presentar un tamaño pequeño (entre 1-3 mm), posee un comportamiento hiperadherente, debido a una mayor expresión de pilis superficiales, posee una capacidad de síntesis de exopolisacáridos Pel incrementada, y carece de movimiento tipo *swarming* debido a la pérdida del flagelo [119,121]. En base a estas propiedades fenotípicas, las SCV poseen una capacidad de formación de biofilms incrementada por lo que son consideradas hiperformadoras de biofilms. De esta manera, una vez establecidas las condiciones experimentales de conversión y reversión, se aislaron colonias SCV y sus correspondientes variantes revertidas obtenidas a partir de las cepas normo e hipermutadora y se procedió a realizar un análisis fenotípico en base a estos rasgos distintivos. Los resultados obtenidos se detallan en la Figura R2.

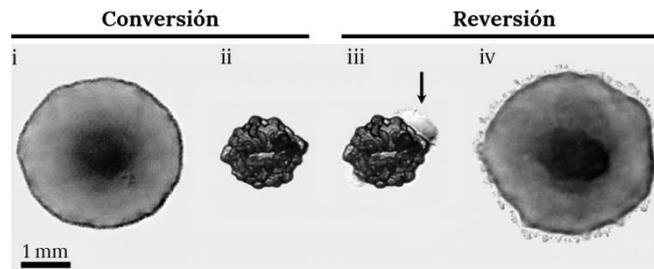


Figura R1: Conversión y reversión al fenotipo SCV. Para analizar el proceso de conversión, las cepas de *P. aeruginosa* parentales (i) fueron crecidas en biofilms realizados *in vitro*. En los biofilms, las células diversifican y se diferencian en distintos clones especialistas, dentro de los cuales, las variantes SCV son frecuentemente observadas y distinguidas por su tamaño pequeño y su aspecto generalmente rugoso (ii). Cuando las SCV son crecidas en placas de agar, se observa un crecimiento a modo de prolongaciones que se extienden desde los bordes de las colonias (flecha, iii). Las células aisladas a partir de estas prolongaciones formaron colonias con una morfología similar a la parental (iv). Para analizar la morfología de las colonias las células fueron crecidas en placas de medios sólidos. Las fotografías fueron tomadas utilizando el microscopio óptico directo Axioplan equipado con un objetivo Olympus 4X y una cámara digital Axiocam.

Primeramente, se evaluó la producción de exopolisacáridos de manera cualitativa a través del ensayo de adherencia al rojo Congo. Este colorante se une a los exopolisacáridos Pel y Psl en los enlaces β (1,3) y β (1,4) [177], mediante uniones no covalentes, de forma tal que mientras mayor sea la producción de exopolisacáridos por la bacteria, mayor será la unión con el colorante y consecuentemente la colonia adoptará un color rojo oscuro. Como se puede observar en la Figura R2-A ii, las variantes SCV analizadas exhibieron una mayor producción de exopolisacáridos con respecto sus parentales y a sus correspondientes variantes revertidas, sin encontrarse diferencias relevantes entre cepas normomutadoras e hipermutadoras.

A continuación, se evaluó la motilidad por *swarming* mediante la siembra de las colonias en agar semisólido, lo cual permite que las bacterias se muevan superficialmente mediante el uso de sus flagelos. La cepa de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 manifiesta su motilidad por *swarming* a través del desarrollo de proyecciones a modo de dendritas que se extienden en todas direcciones en la placa de agar. Tanto las variantes parentales como las revertidas de ambas cepas, WT y *mutS*, mostraron este movimiento característico (Figura R2-A ii) alcanzando un diámetro promedio de las proyecciones de 6.9 ± 0.8 cm para todos los casos (Figura R2-B). Por el contrario, e independientemente de si se ensayaron variantes obtenidas de la cepa WT o hipermutadora *mutS*, las SCV mostraron una marcada reducción en

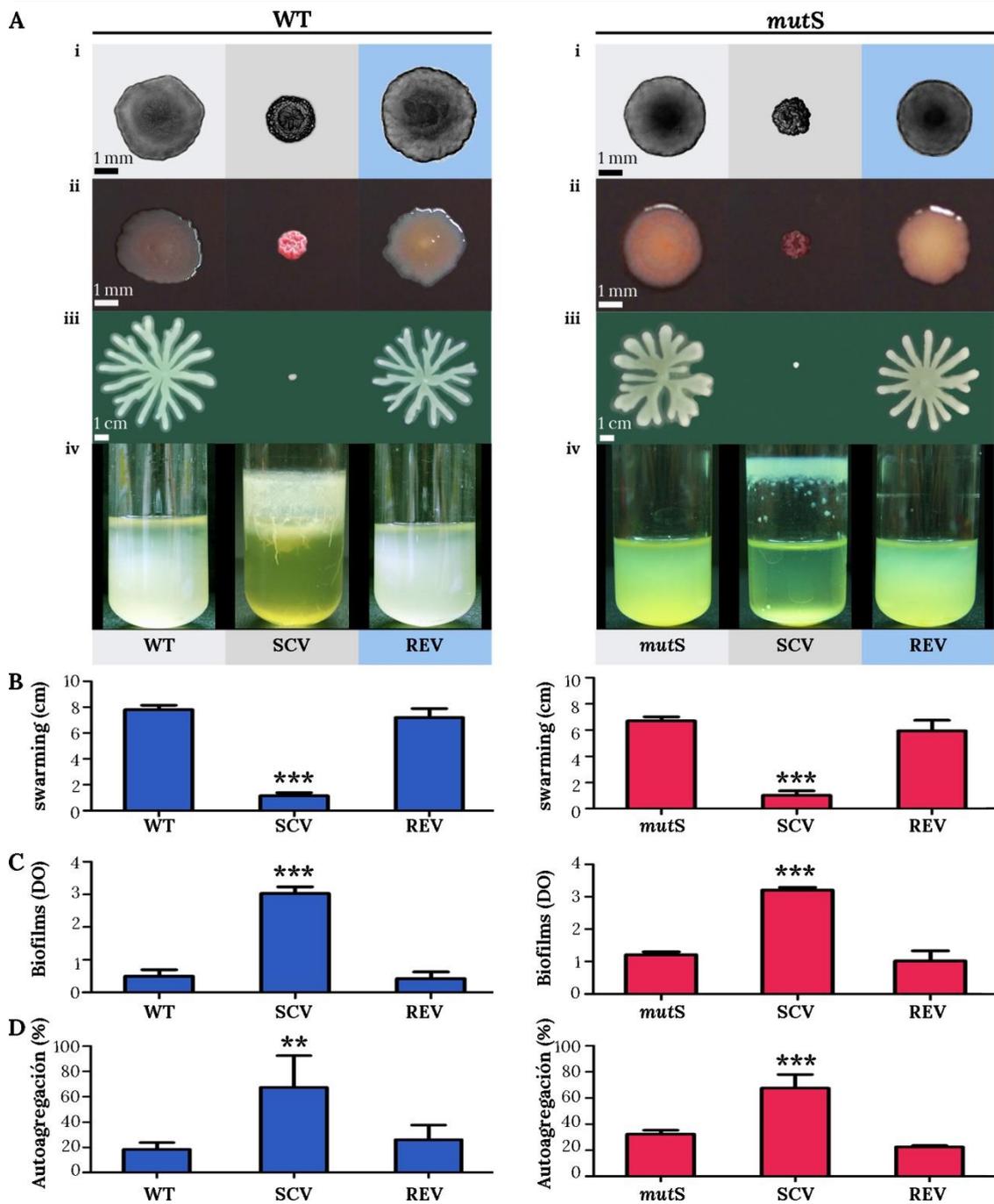


Figura R2. Caracterización fenotípica de las SCV y de las variantes revertidas (REV) obtenidas a partir de las cepas parentales normomutadora WT e hipermutadora mutS. A) Se detallan las propiedades fenotípicas de manera cualitativa: i) morfología de colonias en placas de agar LB, ii) producción de exopolisacáridos a través de la unión de las células al rojo Congo, iii) movimiento tipo swarming, iv) autoagregación (transparencia del cultivo) y producción de biofilms (anillo de crecimiento adherido al vidrio) observadas en cultivos en medios líquidos. B) Determinación del movimiento tipo swarming en medios semisólidos con 0.5% agar por cuantificación del diámetro de las colonias (cm). C) Producción de biofilms determinada mediante la técnica de coloración con cristal violeta. D) Porcentaje de autoagregación medido como la diferencia en el valor de absorbancia (DO) observada entre cultivos saturados crecidos durante una noche y luego de 3 hs de su incubación en condiciones estáticas para permitir el precipitado de las células agregadas. Para todos los casos se expresó el valor correspondiente

al promedio y el error estándar de un mínimo de 4 colonias/cultivos analizadas a partir de 3 experimentos independientes. Los valores obtenidos en las variantes SCV difieren significativamente (One way ANOVA, Tukey post-hoc, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) de los observados en sus respectivas parentales y variantes revertidas. Las fotografías fueron tomadas utilizando una cámara digital Olympus XZ-1, a excepción de las morfologías de colonias en placas de agar, donde las fotografías fueron tomadas utilizando una la cámara Axiocam acoplada a un microscopio óptico directo Axioplan equipado con un objetivo Olympus 4X.

este tipo de movimiento (Figura R2-A iii y R2-B), indicando que la pérdida del movimiento está asociada específicamente a la morfología SCV (One way ANOVA, Tukey post-hoc, $P < 0.001$).

Seguidamente, se estudió la producción de biofilms y el comportamiento autoagregativo, ambas características distintivas del fenotipo SCV. Cabe destacar que el comportamiento autoagregativo se basa en la adherencia entre células mediada por una producción incrementada de pilis, fimbrias, exopolisacáridos y/o adhesinas. Para ello, los cultivos de células saturados se someten a un período de incubación estática en los que las células exhiben este fenómeno por sedimentación, confiriendo un aspecto translúcido al cultivo. Tal como se muestra en la Figura R2 (iv, C y D), tanto la producción de biofilms como la autoagregación fueron significativamente mayores a las variantes SCV con respecto a sus parentales y variantes revertidas. Igualmente a los otros rasgos fenotípicos analizados, no hubo diferencias significativas cuando se analizaron las variantes obtenidas tanto de la cepa normomutadora como de la hipermutadora. Asimismo, en todos los ensayos realizados, los valores de las cepas parentales y de las variantes revertidas no mostraron diferencias significativas dando clara cuenta de la reversión fenotípica sufrida (Figura R2).

1.2. Diversificación fenotípica y frecuencia de reversión del fenotipo SCV.

Con el objeto de continuar con el estudio comparativo entre cepas normomutadoras e hipermutadoras, se procedió a realizar la determinación de los valores de diversidad fenotípica y de emergencia de variantes SCV (Figura R3). Para ello, se realizaron cultivos en biofilms a partir de las cepas WT y *mutS*, los cuales fueron posteriormente cosechados y sembrados en medios de cultivo sólidos con el fin de analizar las distintas morfologías de colonias en ellos emergidas. Para el análisis de diversidad, se utilizó el parámetro ecológico denominado Índice de

Shannon-Weaver (H) [178-180], el cual evalúa la heterogeneidad de una comunidad en base al número de variantes fenotípicas y a la frecuencia de emergencia de cada una, según la siguiente fórmula:

$$H = \frac{N \log N - \sum n \log n}{N}$$

En esta ecuación, N representa el número total de individuos y n es el número de individuos de cada fenotipo presentes en la población estudiada. Así, cuando el Índice H es pequeño (~ 0), significa que la población analizada es altamente homogénea, mientras que su incremento indica un aumento de la diversidad. De esta manera, cuando se estudió la composición fenotípica de los biofilms de la cepa WT, se observó que los mismos estaban formados por básicamente dos tipos de colonias: unas con morfología SCV y otras con una morfología similar a la parental, obteniéndose un valor de H de $0,071 \pm 0,007$ (Figura R3-A y C). Los valores porcentuales entre las dos variantes observadas fue de $91.11 \pm 3.69\%$ de SCVs en relación a la variante tipo silvestre, indicando que la baja capacidad diversificadora de la cepa WT estuvo casi exclusivamente dirigida a la conversión SCV. Por su lado, cuando se analizaron biofilms de la cepa hipermutadora *mutS*, se observó que el mismo estaba compuesto por 6 morfotipos diferentes y con abundancias relativas diversas, dando un valor de H de $0,408 \pm 0,034$, aproximadamente 6 veces mayor y significativamente diferente en términos estadísticos a su contraparte WT (t-test; $P < 0.01$). Esta observación confirma la relación entre hipermutabilidad y el incremento de diversificación fenotípica, tal cual lo determinado en estudios previos a partir de cultivos en biofilms crecidos en cámara de flujo continuos [146]. Entre las 6 distintas variantes emergidas a partir de los biofilms de la cepa *mutS*, las variantes SCV correspondieron a un $40.64 \pm 4.81\%$ de la población (Figura R3-C).

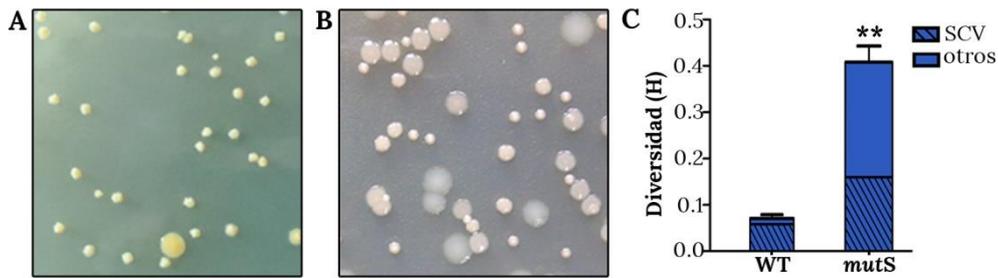


Figura R3. Diversidad fenotípica y frecuencia de emergencia de variantes SCV observada en cultivos en biofilms. Se realizaron cultivos en biofilms a partir de las cepas WT (A) y hipermutadoras *mutS* (B), los cuales fueron posteriormente cosechados y sembrados en placas de agar, con el fin de clasificar y cuantificar las distintas morfologías de colonias. (C) Índice H, el cual representa el grado de heterogeneidad de una comunidad en función al número de variantes presentes y su abundancia relativa (ver Materiales y Métodos). El porcentaje de colonias que representa el fenotipo SCV respecto del número total de colonias analizadas se indica en barras rayadas. Los valores se indican como la media \pm el error estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Las diferencias fueron analizadas para su significancia estadística mediante t-test (** $P < 0.01$).

Seguidamente, se evaluó la frecuencia de reversión de las colonias SCV obtenidas a partir de las cepas WT y *mutS* (Figura R4, ver Materiales y Métodos), observándose que la frecuencia a la cual reversionen las SCV hipermutadoras fue 5 veces mayor que la observada para las SCV normomutadoras (t-test, $P < 0.01$). Este fenómeno de reversión, sería consecuencia de un proceso adaptativo en el que fundamentalmente la readquisición del movimiento mediado por flagelo le permitiría el acceso y obtención de nutrientes durante el desarrollo de la colonia sobre el medio de cultivo sólido. Igualmente, la notable diferencia observada entre las cepas WT e hipermutadora *mutS*, dan cuenta de un proceso heredable el cual estaría basado en mutaciones.

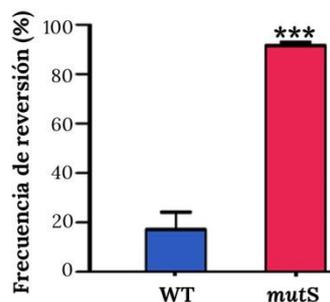


Figura R4. Frecuencia de reversión del morfotipo SCV. Porcentaje de colonias SCV que evidenciaron signos claros de reversión durante el crecimiento en medios de cultivo sólidos, a través del desarrollo de prolongaciones de células móviles desde los bordes de las colonias. Los valores representan la media \pm error estándar de tres experimentos realizados por triplicado. Las diferencias fueron analizadas para su significancia estadística mediante t-test (***) $P < 0.001$.

1.3. Análisis de la competitividad de las variantes SCV normomutadoras e hipermutadoras.

Con el fin de analizar los aspectos adaptativos relacionados al fenómeno de conversión y reversión SCV, se procedió a evaluar la capacidad competitiva del fenotipo SCV frente a las variantes parentales WT y *mutS* así como frente a sus respectivas variantes revertidas, mediante ensayos de cultivos en biofilms mixtos. En todos los casos la proporción inicial de cada competidor fue 1:1 y se utilizaron pares de competidores diferencialmente marcados con la proteína GFP (ver Materiales y Métodos). Se determinó una proporción inicial y una proporción final al cabo de 4 días de cultivo para cada competidor mediante la inspección visual de las colonias utilizando un microscopio óptico directo equipado con un objetivo 4X, una cámara digital y un filtro de fluorescencia. Los resultados de competencia se expresaron en términos de aptitud o *fitness*, el cual es un parámetro evolutivo que describe la capacidad de un individuo con determinado genotipo de reproducirse en un ambiente en particular. Este valor de *fitness* se calcula determinando la proporción de descendientes de un individuo respecto del total de individuos presentes en la siguiente generación. Así, un individuo con más aptitud aumentará su frecuencia de descendientes en las siguientes generaciones y su valor de *fitness*, relativo a los otros individuos presentes en la población, será mayor. De esta manera, el valor de *fitness* relativo se determinó mediante el Índice de Malthusian (*W*), el cual es un valor adimensional que se calcula en base a la siguiente fórmula:

$$W = \frac{\ln \left[\frac{N_j(1)}{N_j(0)} \right]}{\ln \left[\frac{N_i(1)}{N_i(0)} \right]}$$

En esta fórmula, los valores $N(0)$ y $N(1)$ indican la proporción inicial y final de individuos, respectivamente y los sufijos *i* y *j* hacen referencia a cada competidor de modo que los valores mayores a 1 indican un *fitness* relativo mayor para el competidor expresado en el numerador [181].

Con respecto a los experimentos realizados entre las variantes obtenidas a partir de la cepa normomutadora (Figura R5-A), se observó que para la

competencia entre el fenotipo SCV y su cepa parental, el valor de *fitness* relativo fue de 1.504 ± 0.020 , valor estadísticamente diferente a 1 (Figura R5-A, t-test media teórica=1, $P < 0.001$). Del mismo modo, las competencias entre SCV y sus variantes revertidas, resultó en un valor de *fitness* relativo de 2.243 ± 0.223 el cual fue igualmente estadísticamente diferente a 1 (Figura R5-A, t-test media teórica=1, $P < 0.01$). Cuando se realizaron los experimentos de competencia entre las variantes parentales y revertidas normomutadoras, el valor de *fitness* relativo fue igual a 1.152 ± 0.199 (Figura R5-A, t-test media teórica=1, $P = 0.509$), valor no estadísticamente diferente a 1, que indica que las variantes revertida y la parental WT compiten equitativamente, dando una proporción final que resulta similar cuando son co-inoculadas en un biofilm. Estos resultados indican que las subpoblaciones de SCV poseen una clara ventaja competitiva en cultivos en biofilms respecto a las variantes parental y revertida, sugiriendo que su emergencia durante el crecimiento en biofilms es netamente adaptativa. Asimismo, la menor capacidad competitiva de la variante revertida frente a la SCV sugiere que las mutaciones responsables del proceso de reversión no implican una variación de fase completa ni la recuperación de todas las propiedades de la cepa parental.

Cuando los mismos ensayos fueron realizados entre cepas hipermutadoras, los resultados fueron equivalentes (Figura R5-B): las colonias SCV mostraron un mayor *fitness* en cultivos en biofilms cuando fueron inoculadas junto a sus variantes parentales *mutS* (Figura R5-B, $W = 1.375 \pm 0.03$, $P < 0.01$), e igualmente compitieron mejor respecto a sus variantes revertidas (Figura R5-B, $W = 2.56 \pm 1.54$, $P < 0.01$). Al mismo tiempo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las competencias entre las variantes parental hipermutadora y la revertida (Figura R5-B, $W = 1.170 \pm 0.127$; $P = 0.274$).

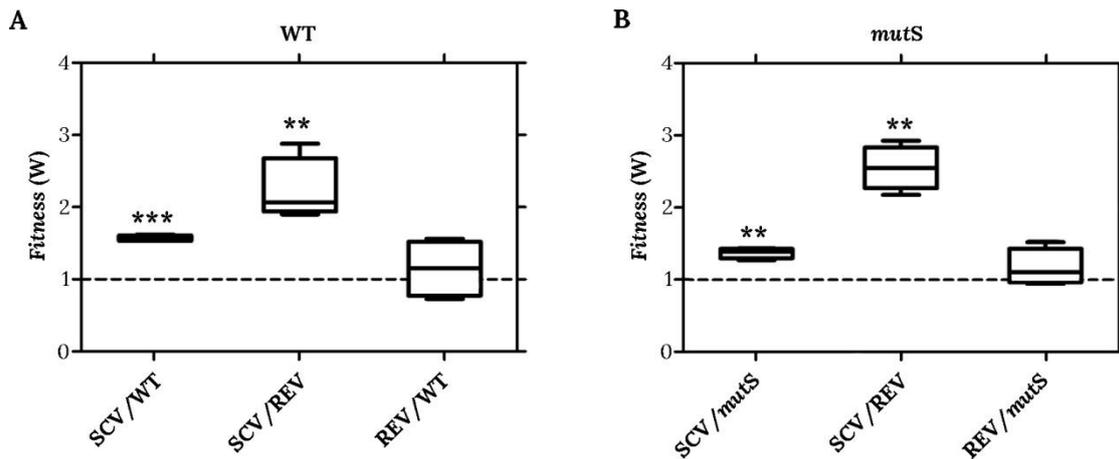


Figura R5. Ensayos de competencia en cultivos en biofilms. Competencias realizadas entre las variantes SCV, las variantes parentales (WT y mutS) y las variantes revertidas (REV) de las cepas normomutadoras (A) e hipermutadoras (B). Los cultivos en biofilms fueron inoculados con cada uno de los competidores diferencialmente marcados con la proteína GFP y en una proporción inicial de 1:1. Los mismos experimentos se llevaron a cabo con la marca cruzada para descartar algún efecto del cassette de GFP en el fitness. En el eje de las ordenadas se expresa el valor de fitness relativo expresado como el índice de Malthusian (W) obtenido a partir de cuatro replicas independientes. Los asteriscos significan que hubo evidencia estadística suficiente para diferenciar la media obtenida experimentalmente de la media teórica (t-test, media teórica=1, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Antecedentes previos realizados en nuestro laboratorio, indican que cepas deficientes en el gen *mutS* poseen una ventaja competitiva con respecto a cepas normomutadoras específicamente en cultivos en biofilms, a diferencia de cultivos líquidos mantenidos en agitación constante [146]. Esto sugiere que a mayor heterogeneidad del ambiente, mayor competitividad por parte de las hipermutadoras, dada una mayor capacidad de diversificar y de proveer de una mayor proporción de variantes fenotípicas, las cuales son enriquecidas por selección debido a sus capacidades adaptativas para el crecimiento en el ambiente del biofilm [146].

En base a estos antecedentes previos y a la mayor capacidad diversificadora manifestada por la cepa hipermutadora (Figuras R3 y R4), se intentó profundizar en el análisis de la asociación entre diversificación fenotípica y adaptabilidad a través de ensayos de competencia entre las variantes parentales normomutadora e hipermutadora *mutS* y sus respectivas especialistas SCV. Para ello y en primer lugar, se determinaron los valores de Índice de Shannon-Weaver (H) tanto en cultivos en biofilms como en cultivos líquidos de las SCV y sus respectivas cepas parentales (ver Materiales y Métodos). Tal como se muestra en la

Figura R6-A, la cepa parental *mutS* mostró un valor de diversidad fenotípica en cultivos en biofilms significativamente mayor respecto al obtenido durante su crecimiento en cultivos líquidos. Este valor fue a su vez, significativamente mayor al de la cepa WT, la cual a pesar de un leve incremento, no mostró diferencias significativas en cultivos en biofilms respecto a cultivos líquidos (Figura R6-A). Notablemente, la conversión al fenotipo SCV y la consecuente especialización, en la cepa hipermutadora conllevó a la pérdida de su capacidad diversificadora en biofilms, ya que de ellos se obtuvieron valores de H significativamente menores y que no se diferenciaron estadísticamente de los obtenidos a partir de cultivos líquidos ensayados con la misma cepa a todos los ensayos con la cepa WT (Figura R6-A).

Posteriormente, se procedió a determinar la competitividad mediante la realización de co-cultivos entre ambas cepas parentales crecidas en biofilms (Figura R6-B). El valor de *fitness* relativo obtenido fue de 1.500 ± 0.038 , mostrando una diferencia estadísticamente significativa respecto a 1 (t-test, media teórica=1, $P < 0.001$). Esta mayor competitividad de la cepa hipermutadora fue observada particularmente en cultivos en biofilms, ya que en cultivos líquidos, el valor de *fitness* relativo bajó a 1.013 ± 0.003 indicando una competitividad equivalente en relación a la WT (Figura R6-B, $P = 0.0710$). Sin embargo, cuando se analizó el *fitness* relativo entre las variantes SCV en cultivos en biofilms, el valor de *fitness* relativo fue de $1.114 \pm .040$ (Figura R6-B), valor que, aunque estadísticamente diferente a 1 ($P < 0.05$), representa una marcada reducción en relación a la mayor competitividad manifestada por la cepa hipermutadora parental. Así, este resultado nos permite confirmar que el mayor grado de competitividad de las cepas hipermutadoras en el biofilm estaría directamente relacionado con su capacidad diversificadora. Cuando esta capacidad disminuye, como en el caso de la variante SCV hipermutadora (Figura R6-A), la competitividad disminuye en forma correlativa (Figura R6-B).

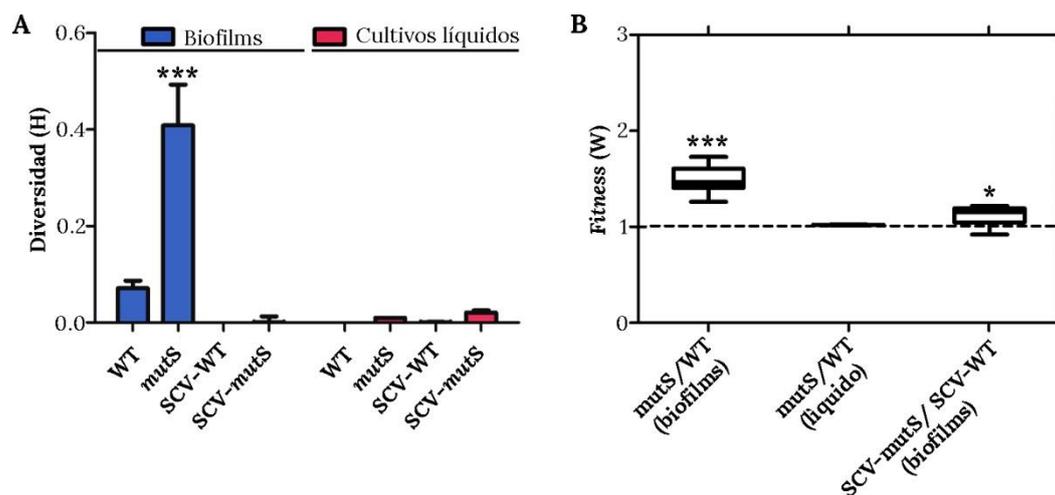


Figura R6. Determinación de la diversificación fenotípica y competitividad entre cepas normomutadoras e hipermutadoras. (A) Diversificación fenotípica determinada por el Índice de Shannon-Weaver (H) de las cepas parentales normomutadoras (WT) e hipermutadoras (*mutS*) y de sus respectivas SCV ensayadas en cultivos en biofilms (barras azules) y en cultivos líquidos (barras rosas). Las diferencias fueron analizadas para su significancia estadística mediante la prueba One-way ANOVA, Tukey post-hoc (***) $P < 0.01$). (B) Competitividad determinada a través del Fitness relativo (W) entre las cepas ancestrales (WT y *mutS*) y entre las variantes SCV en cultivo en biofilms (ambiente heterogéneo) o en cultivos líquidos mantenidos en agitación (ambiente homogéneo). Cada competencia fue realizada utilizando pares de competidores diferencialmente marcados con la proteína GFP. Se expresa el valor de fitness relativo como el índice de Malthusian (W) obtenido a partir de cuatro replicas independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas a 1 (t-test, media teórica=1, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

De esta manera, la hipótesis queda claramente establecida: la hipermutabilidad confiere un mayor *fitness* particularmente en ambientes heterogéneos, en donde la diversificación y la variabilidad genética subyacente resultan beneficiosas. Sin embargo, es posible plantear otras posibilidades que previamente son necesarias descartar: i) el aumento en la competitividad puede estar relacionada a la presencia en la cepa *mutS* de alguna/s mutación/es adquiridas en forma previa y que resultan benéfica/s para el crecimiento en biofilms, ii) existe un efecto polar resultante de la construcción de la cepa *mutS* que tiene efectos beneficiosos para el crecimiento en biofilms. Para analizar estas alternativas, se procedió a realizar un ensayo de complementación génica mediante la transformación de la cepa hipermutadora con un plásmido que restituya la función del MRS para posteriormente evaluar nuevamente la competitividad. A través de esta aproximación experimental, la disminución del *fitness* se observaría únicamente si el fenómeno fuera consecuencia de la mayor

tasa de mutación característica de la hipermutabilidad. Para llevar a cabo este experimento, se construyó el plásmido p3::mutS, el cual deriva del plásmido p3 [182] y alberga una copia funcional del gen *mutS*. Este plásmido fue utilizado para transformar la cepa hipermutadora *mutS* (ver Materiales y Métodos). Primeramente, para confirmar la eficiencia de la complementación, se analizó la frecuencia de mutación mediante la determinación de la frecuencia de emergencia de células resistentes a estreptomycin (Sm) cada 10^8 células viables. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla R1 e indicaron que, si bien los valores de frecuencia de mutación de la cepa complementada no alcanzaron los valores de la cepa normomutadora WT, la complementación con el plásmido p3::mutS permitió una disminución significativa de la frecuencia de mutación de aproximadamente 2 órdenes de magnitud con respecto a la cepa *mutS* hipermutadora.

Seguidamente, tanto la cepa *mutS* complementada, como los controles WT y *mutS*, fueron caracterizados en función a su capacidad diversificadora a través de la determinación del Índice H de Shannon-Weaver (ver Materiales y Métodos) en cultivos en biofilms. Como se observa en la Figura R7-A, los resultados mostraron que la disminución de la tasa de mutación en la cepa complementada estuvo acompañada de una disminución de la diversidad H, expresada tanto en número como en frecuencia de variantes fenotípicas diferentes surgidas a partir de cada uno de los biofilms. Consecuentemente, el valor de diversidad alcanzó aquellos obtenidos con la cepa normomutadora WT, de la cual no se diferenció significativamente en términos estadísticos.

Tabla R1. Frecuencia de mutación espontánea de las cepas de *P. aeruginosa* evaluada como frecuencia de células resistentes a estreptomycin.

Cepa	Frecuencia ¹
WT-p3	$(4,3 \pm 2,4) \times 10^{-10}$
<i>mutS</i> -p3	$(3,4 \pm 2,7) \times 10^{-7}$
<i>mutS</i> -p3::mutS	$(3,5 \pm 1,3) \times 10^{-9}$

¹Los valores se expresan como el número de células resistentes cada 10^8 células viables. Las cepas controles WT y *mutS* fueron transformadas utilizando el plásmido p3 vacío. La concentración de antibiótico en todos los casos fue de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

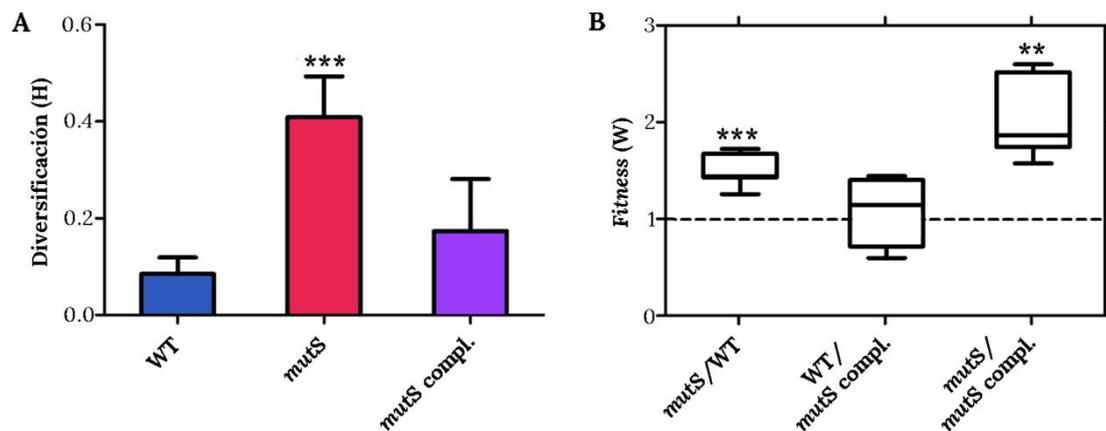


Figura R7. Efecto de la complementación de la hipermutabilidad sobre la diversificación fenotípica y la competitividad en *P. aeruginosa*. A) Diversificación fenotípica en cultivos en biofilms determinada a través del Índice H de Shannon-Weaver. Se expresa el valor correspondiente al promedio de cuatro réplicas independientes junto con el desvío estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (One way ANOVA, Tukey post-hoc, *** $P < 0.001$). Como controles, el índice H fue determinado en la cepa hipermutadora *mutS* y en la cepa normomutadora WT, ambas transformadas con el plásmido p3 vacío. B) Experimentos de competencia evaluadas en cultivos en biofilms entre la cepa complementada (*mutS*-compl) respecto a la cepa WT y a la *mutS*. Los experimentos fueron realizados utilizando pares de competidores marcados diferencialmente con la proteína GFP. Se expresa el valor de fitness relativo como el índice de Malthusian (W) obtenido a partir de cuatro replicas independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto a 1 (t-test, media teórica=1, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Cuando se evaluó la competitividad en cultivos en biofilms, se observó que a diferencia de la mayor competitividad mostrada por la cepa *mutS* con respecto a la WT ($W = 1.491 \pm 0.051$, $P < 0.001$), el fitness relativo de la cepa complementada respecto a la WT mostró valores cercanos a 1 ($W = 1.02 \pm 0.15$, t-test, media teórica=1, $P = 0.886$) indicando que ambas compiten equitativamente en estas condiciones (Figura R7-B). Las competencias entre la *mutS* y la *mutS* complementada confirmaron este resultado, ya que demostraron una pérdida de competitividad de la cepa con menor frecuencia de mutación y menor capacidad diversificadora ($W = 2.04 \pm 0.16$, t-test, media teórica=1, $P < 0.01$, Figura R7-B).

De esta manera, se puede afirmar que la ventaja competitiva observada en cultivos en biofilms en cepas deficientes en *mutS* está asociada al incremento de la diversificación fenotípica, dado que cuando cepas hipermutadoras son complementadas con una copia funcional del gen *mutS* y su tasa de mutación restituida, la capacidad diversificadora y consecuentemente la competitividad en biofilms disminuyen, alcanzando valores similares a los obtenidos con la cepa WT.

CAPÍTULO II. FLEXIBILIDAD GENÉTICA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA EN EL PROCESO DE CONVERSIÓN Y REVERSIÓN AL FENOTIPO SCV EN ENSAYOS EVOLUTIVOS IN VITRO: IMPLICANCIA DE LA HIPERMUTABILIDAD.

En el Capítulo anterior se caracterizó el fenómeno de conversión y reversión al fenotipo SCV de *P. aeruginosa* en condiciones *in vitro*. Estas variantes emergen espontáneamente en cultivos en biofilms y son seleccionadas por sus propiedades fenotípicas distintivas (Figura R2), las que les brindan una mayor competitividad frente a las variantes silvestres en este ambiente particular (Figura R5). Como contrapartida, el fenómeno de reversión SCV conlleva a la pérdida de estas propiedades (Figura R2) y a la consecuente disminución de la competitividad en cultivos en biofilms (Figura R5). Los procesos de diversificación y reversión SCV se ven significativamente incrementados en cepas hipermutadoras (Figura R3 y R4), y esta observación sugiere que los mismos estarían basados en eventos mutagénicos y que consecuentemente la hipermutabilidad posee una directa implicancia en la adaptación durante al ciclo de formación y dispersión de biofilms. Teniendo en cuenta que en las infecciones pulmonares crónicas en pacientes con FQ, un único clon ancestral de *P. aeruginosa* se establece mediante un proceso de diversificación genética, sufriendo de ciclos sucesivos de formación y dispersión de biofilms, a continuación se intentó determinar cuál es la capacidad de una variante revertida de reiniciar un nuevo ciclo de conversión SCV para nuevamente revertir su fenotipo y así de manera sucesiva. Frente a este objetivo se plantearon los siguientes interrogantes: i) ¿cuál es la capacidad o flexibilidad genética que posee un mismo clon de *P. aeruginosa* para la conversión y reversión sucesiva al fenotipo SCV?; ii) ¿cuál es la implicancia de un incremento en la tasa de mutación en este proceso?; iii) ¿las propiedades fenotípicas de las SCV y las variantes revertidas se mantienen estables a lo largo de ciclos sucesivos de evolución?; iv) ¿cuál es la frecuencia de conversión y de reversión SCV a medida que los ciclos evolutivos avanzan? A continuación, se describen los diseños experimentales y los resultados obtenidos que pretenden dar respuesta a estos interrogantes.

2.1. Modelo de evolución *in vitro*.

Con el objeto de analizar el fenómeno de conversión y reversión SCV en forma sucesiva, se diseñó un modelo evolutivo experimental (Figura R8) en el que un mismo clon de *P. aeruginosa* fue sometido a condiciones que favorecen la conversión SCV (cultivos en biofilms) y posteriormente, una vez convertido, a condiciones que favorecen su reversión (cultivos en medios sólidos), de acuerdo a lo establecido en el Capítulo anterior (Figura R1). En cada ciclo evolutivo, una única colonia fue seleccionada al azar, de tal forma que un único clon SCV fue utilizado para fundar el ciclo de reversión posterior (Figura R8-A), a partir del cual una única colonia revertida, seleccionada al azar, fue utilizada como inóculo en la siembra de un nuevo cultivo en biofilm (Figura R8-B), repitiendo de esta manera el procedimiento. En todos los casos, los clones seleccionados, así como el biofilm cosechado en cada evento de conversión, fueron conservados a -80°C para su posterior análisis. Asimismo, el diseño incluyó la evaluación de una serie de líneas evolutivas independientes, a modo de réplicas biológicas, con el fin de analizar el posible paralelismo evolutivo implicado en la adaptación a este proceso. Estas líneas paralelas fueron fundadas a partir de un cultivo ancestral único obtenido a partir de la cepa de *P. aeruginosa* normomutadora WT y la cepa hipermutadora *mutS* (Figura R8-C), lo cual permitió a su vez investigar el efecto de la hipermutabilidad en el proceso evolutivo.

Este diseño de evolución experimental incluyó dos parámetros importantes a destacar: i) una selección genética artificial, ya que sólo pueden propagarse en la siguiente generación aquellas variantes con una morfología SCV seleccionadas en los ciclos de conversión o bien, con una morfología revertida seleccionada en los ciclos de reversión y ii) un efecto de deriva génica, dado que al seleccionar al azar una única colonia dentro la población, la cual será el ancestro de la generación subsiguiente, en cada ciclo de evolución se produce un efecto de cuello de botella. Dentro de los criterios experimentales impuestos al diseño, se consideró que cuando la frecuencia de conversión o de reversión SCV fuera menor al 0.01%, la línea evolutiva sería detenida. Este criterio arbitrario fue pre-establecido con el objeto de garantizar un mínimo de colonias a analizar, de tal

forma que la elección de los clones SCV o revertidos en cada ciclo evolutivo estuviera siempre mediada por azar.

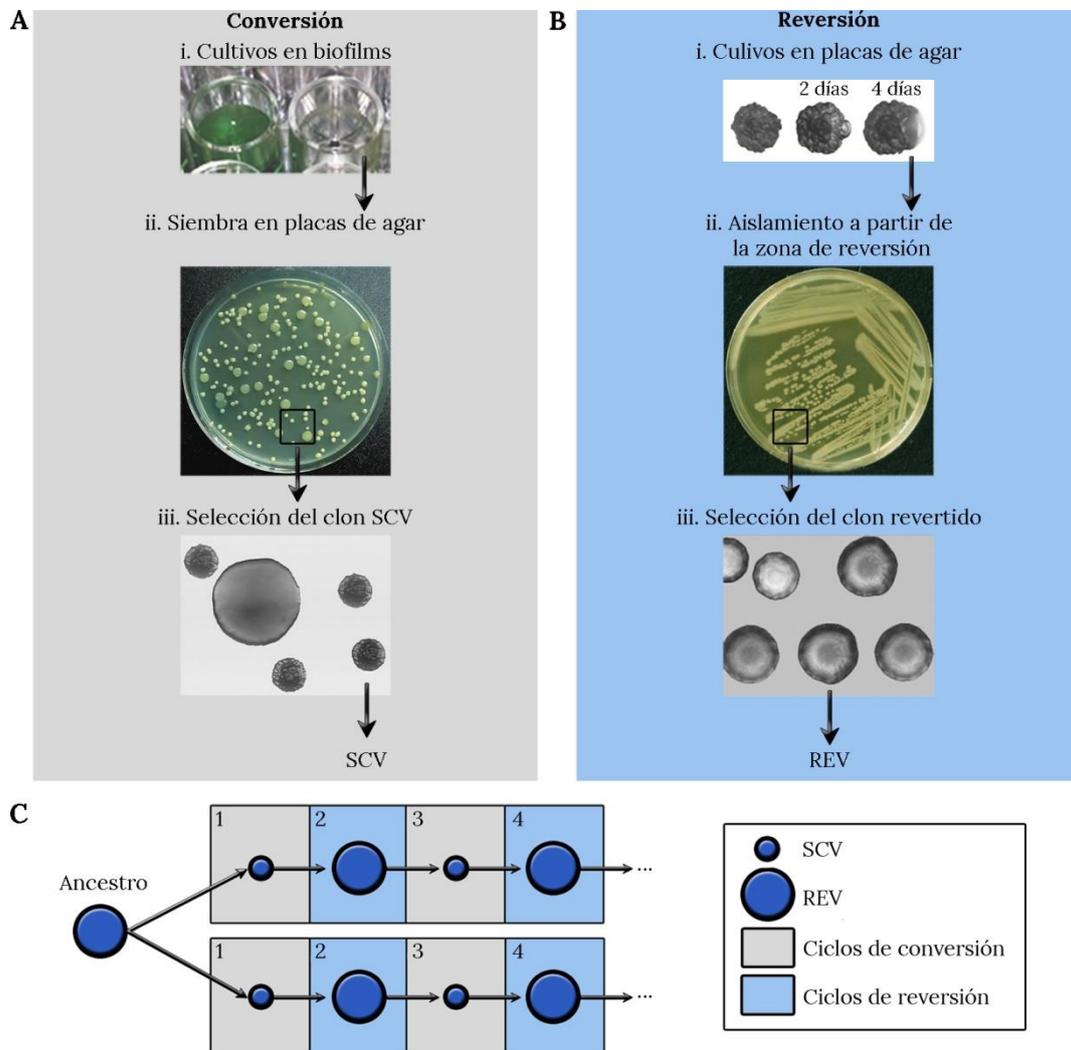


Figura R8. Modelo evolutivo diseñado para el estudio de la capacidad de conversión y reversión sucesivas al fenotipo SCV en *P. aeruginosa*. (A) Los ciclos de conversión fueron definidos como eventos de cultivos en biofilms realizados en microplacas de poliestireno durante 4 días de incubación en condiciones estáticas. En estas condiciones, las bacterias se adhieren a las paredes del plástico formando el biofilm como un anillo de crecimiento (i). Cuando este biofilm es cosechado y sembrado en medios de cultivo sólidos, se observa el fenómeno de diversificación fenotípica, en el cual las colonias representantes del biofilm exhiben diferentes morfologías (ii). Posteriormente, un único clon SCV es seleccionado al azar (iii) para constituir el ancestro del ciclo de reversión subsiguiente. (B) Los ciclos de reversión fueron definidos como eventos de cultivos en medios sólidos durante 4 días. Para ello, el clon SCV seleccionado es disgregado y sembrado en placas de agar MacConkey, en los cuales una frecuencia variable de colonias SCV exhibe signos de reversión como prolongaciones que se extienden desde los bordes de las colonias (i). Desde esta zona de reversión, se aíslan células en nuevas placas de agar (ii) y de aquellas colonias con morfología revertida, una es seleccionada al azar para iniciar el ciclo de conversión subsiguiente (iii). (C) El diseño experimental incluyó varias líneas evolutivas iniciadas a

partir de un ancestro común. Las SCV se esquematizan como círculos pequeños y las revertidas como círculos grandes. Los números indican el ciclo de evolución a partir del cual cada clon fue seleccionado. Los ciclos de conversión y reversión están representados en rectángulos grises o celestes, respectivamente.

2.2. Determinación de la flexibilidad genética de las cepas de *P. aeruginosa* normomutadoras para la conversión y reversión SCV en forma sucesiva.

En base al modelo evolutivo experimental diseñado, a partir de un único cultivo de la cepa de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 WT, denominada ancestro WT0, se fundaron 5 líneas evolutivas paralelas normomutadoras. Estas líneas fueron denominadas WT1, 2, 3, 4 y 5. Del mismo modo, se fundaron 4 líneas evolutivas paralelas a partir de un cultivo obtenido a partir del ancestro hipermutador, denominado *mutS0*, las cuales fueron a su vez denominadas *mutS* 1, 2, 3 y 4 (Figura R9).

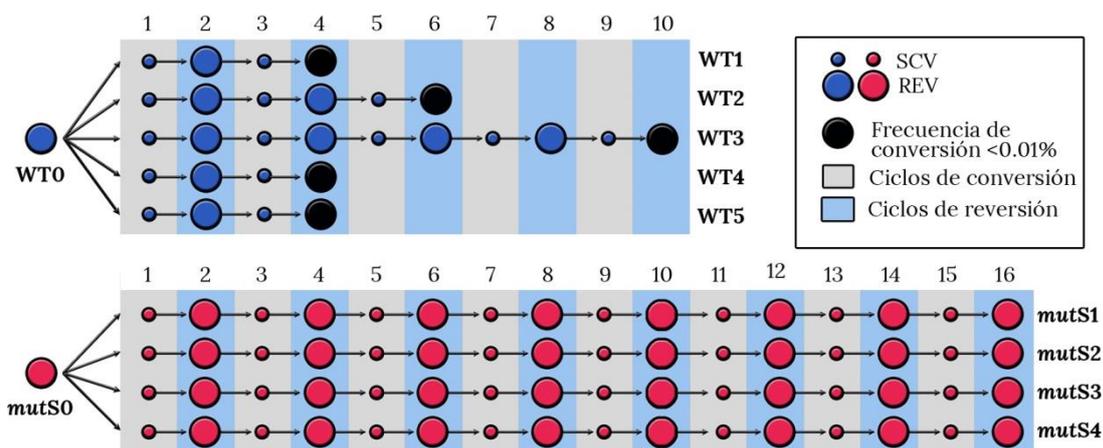


Figura R9: Ensayo de evolución in vitro de las cepas de *P. aeruginosa* normomutadoras e hipermutadoras sucesivamente expuestas a ciclos de conversión y reversión SCV. En la Figura se muestra la evolución de 5 líneas paralelamente fundadas a partir del ancestro WT0 y 4 líneas derivadas del ancestro *mutS0*. Cada línea fue sometida de manera independiente a sucesivos ciclos de conversión (barras grises) y reversión (barras celestes) al fenotipo SCV. Los círculos pequeños señalan colonias SCV y círculos grandes hacen referencia a las variantes revertidas, ambas seleccionadas como fundadores en cada ciclo de evolución, mientras que los números indican los ciclos evolutivos sucesivos. A la derecha se indica la nomenclatura elegida para identificar a cada una de las líneas. Los círculos negros indican variantes a partir de las cuales el cultivo en biofilms mostró una frecuencia de conversión al morfotipo SCV menor al 0.01% por lo cual, de acuerdo al criterio previamente establecido, la evolución de esta línea fue dada por finalizada. Para el caso de las líneas hipermutadoras, el experimento fue finalizado de manera arbitraria en el ciclo 16 de evolución, dado que no se produjo en ninguna de ellas una disminución de la frecuencia menor al 0.01%.

Tal como se muestra en la Figura R9, para el caso de las líneas normomutadoras, se observó que a medida que los ciclos evolutivos avanzaban, las frecuencias de emergencia de variantes SCV disminuían, siendo esta disminución muy significativa a partir del ciclo 5 de evolución (Figura R10-A). De hecho, 3 de las 5 líneas evolutivas fundadas generaron biofilms en el ciclo 5 donde la frecuencia de variantes SCV fue menor al 0.01% (Figura R9), por lo que el experimento en estas líneas fue dado por terminado en el ciclo 4 de evolución. Esta caída en el valor de frecuencia de conversión SCV en el ciclo 5, contrastó con valores altos de conversión en los primeros ciclos 1 y 3, en los que la frecuencia promedio de conversión alcanzó valores de entre $91.1 \pm 3.7\%$ y $83.1 \pm 8.2\%$, respectivamente.

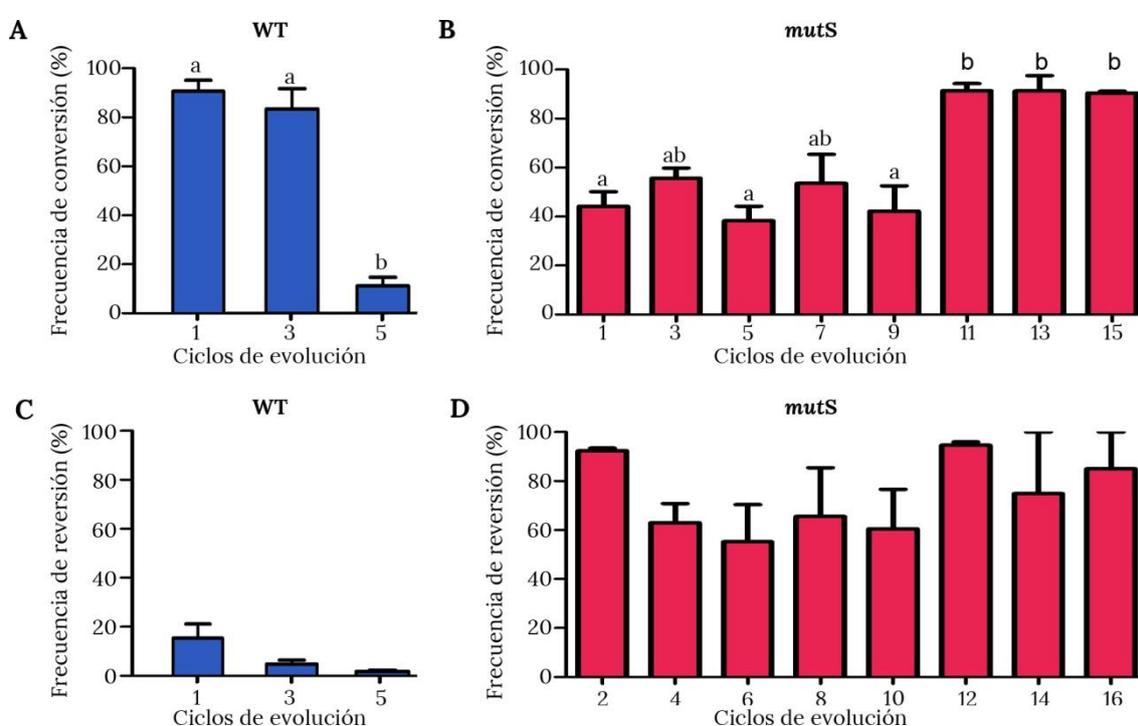


Figura R10. Frecuencias de conversión y de reversión al fenotipo SCV de *P. aeruginosa* en el modelo de evolución *in vitro*. Frecuencias de conversión (A y B) y frecuencia de reversión (C y D) determinadas a lo largo de los distintos ciclos evolutivos en las 5 líneas normomutadoras (A y C) y las 4 líneas hipermutadoras (B y D). Las frecuencias fueron calculadas a partir de la inspección de aproximadamente 10.000 colonias. Se expresan los promedios \pm el error estándar del conjunto de líneas fundadas a partir de cada ancestro. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (One way ANOVA, Tukey post-hoc, $P < 0.05$).

La restricción producida en el ciclo 5 de evolución, a la que las líneas WT1, WT4 y WT5 no pudieron superar, constituyó un valor promedio entre las dos líneas

restantes, WT2 y WT3, significativamente menor del $10.9 \pm 5.4\%$ (Figura R10-A). Pasada esta restricción, la línea WT2 no superó el ciclo 7 de evolución (valores de conversión menores al 0.01%), mientras que la línea WT3 avanzó hasta el ciclo 10 de evolución, pero con valores de conversión sumamente bajos de 2.46% y 1% en los ciclos los ciclos 7 y 9, respectivamente.

Respecto a los ciclos de reversión de las líneas normomutadoras, los valores fueron bajos inicialmente y en continua disminución, constituyendo un promedio de $15.3 \pm 5.3\%$ y $4.8 \pm 1.6\%$ en los ciclos 2 y 4, respectivamente (Figura R10-C). Este valor siguió disminuyendo en el ciclo 6, en el que WT2 y WT3 promediaron un valor de $1.8 \pm 0.5\%$ de reversión (Figura R10-C), mientras que para los ciclos 8 y 10, transcurridos sólo por la línea WT3, los valores fueron de 2.2% y 0.1%, respectivamente.

Notablemente y por el contrario, al analizar las líneas hipermutadoras, éstas se adaptaron al régimen de conversión y reversión del fenotipo SCV sucesivo, sin sufrir una restricción aparente en ningún ciclo de evolución, por lo que se decidió finalizar el experimento en el ciclo 16 de manera arbitraria (Figura R9). Así y tal como se observa en la Figura R10-B, las frecuencias de conversión iniciales entre los ciclos 1 y 9 de evolución variaron entre el 35 y 55% promedio. Cabe destacar que la emergencia de SCV en todos los casos, estuvo acompañada por la emergencia de otras variantes dada la alta capacidad diversificadora de estas cepas, que manifestaron valores de H equivalentes a los mostrados anteriormente (Figura R3). Sumado a la ausencia de restricciones aparentes en el transcurso de los ciclos de evolución, cabe destacar que la frecuencia de conversión SCV incluso incrementó en los últimos ciclos, alcanzando en promedio un $87.8 \pm 7.5\%$ (Figura R10-B), aumento que estuvo acompañado por una disminución de la diversidad (datos no mostrados). Al igual que lo observado en los ciclos de conversión, las 4 líneas evolutivas hipermutadoras, aunque con valores variables, no sufrieron ningún tipo de restricción ni disminución significativa en la frecuencia de reversión. Tal como se observa en la Figura R10-D, los valores de frecuencia de reversión fueron en todos los casos significativamente mayores a los observados en las líneas normomutadoras, variando entre un 50 y 90%.

Con el objeto de analizar con mayor profundidad el fenómeno de restricción producido en el ciclo 5 de evolución en líneas normomutadoras, a partir del mismo clon revertido seleccionado en el ciclo 4 de evolución de la línea WT1, se fundaron 3 nuevos cultivos en biofilms y se determinó la frecuencia de conversión SCV en cada uno de ellos. Estas sublíneas evolutivas derivadas de la línea WT1 fueron denominadas WT1A, WT1B y WT1C. Tal como se observa en la Tabla R2, los valores de conversión SCV obtenidos para la línea WT1A estuvieron muy cercanos al límite impuesto (0.011%) y la línea WT1B mostró un porcentaje del 0.34%. Por su lado, la línea WT1C alcanzó valores porcentuales del 13.6%. Este último valor, aunque claramente mayor a las líneas paralelas WT1, WT1A y WT1B, fue a su vez similar al promedio obtenido en este mismo ciclo para las líneas evolutivas WT2 y WT3 (12.2 ± 3.3 , Figura R10-A), confirmando la restricción observada en el ciclo 5 de evolución. El mismo experimento fue llevado a cabo con los clones revertidos seleccionados en el ciclo 6 de la línea WT2 y en el ciclo 10 en la línea WT3, ambos constituyendo el fin de la historia evolutiva en cada caso (Figura R9). Notablemente, mientras que en el caso del clon WT2 se observó una frecuencia de conversión promedio de $3.47 \pm 0.02\%$, los biofilms fundados a partir del clon detenido en el ciclo 10 mostraron en todos los casos frecuencias de conversión SCV menores a 0.01% (Tabla R2), indicando una restricción cada vez más marcada a medida que avanza la sucesión de ciclos de conversión/reversión en este esquema evolutivo.

Tal como se expuso anteriormente, los resultados indican que la frecuencia de conversión al fenotipo SCV en las líneas normomutadoras disminuye conforme los ciclos evolutivos avanzan. Más aún, todas las líneas WT manifestaron una marcada restricción en la conversión SCV a partir del ciclo 5 de evolución (Figura R10-A). Como contrapartida, ninguna de las 4 líneas hipermutadoras evidenció este fenómeno de restricción en ningún ciclo de conversión analizado (Figura R10-B). Con el propósito de evaluar estadísticamente la influencia de las variables cepa y ciclo evolutivo en la frecuencia de conversión SCV, los valores de frecuencia de conversión SCV correspondientes a los ciclos 1, 3 y 5 se ajustaron a un modelo estadístico lineal de efectos mixtos (MLM) [183]. En base a las predicciones realizadas por este modelo estadístico aplicado (Figura R11), las

frecuencias de conversión al fenotipo SCV disminuyen en la cepa normomutadora conforme los ciclos evolutivos transcurren, mientras que dichas frecuencias permanecen prácticamente constantes para el caso de la cepa hipermutadora (MLM: cepa x ciclo, $X^2_1=16.154$, $P<0.001$).

Tabla R2. Frecuencia de conversión al fenotipo SCV observada en los clones finales pertenecientes a las líneas evolutivas WT1, 2 y 3 en cultivos en biofilms.

Clon	Biofilm	Frecuencia de conversión ¹
WT1R4	Original	<0,01%
	A	0,01%
	B	0,30%
	C	13,60%
WT2R6	Original	<0,01%
	A	2,21%
	B	5,56%
	C	2,65%
WT3R10	Original	<0,01%
	A	<0,01%
	B	<0,01%
	C	<0,01%

¹ Las frecuencias de conversión fueron calculadas a partir de la inspección visual de aproximadamente 10.000 colonias. A partir de cada clon revertido seleccionado en los ciclos 4 (línea WT1), 6 (línea WT2) y 10 (línea WT3), se crecieron tres cultivos en biofilms independientes (A, B y C), los cuales fueron cosechados y sembrados en placas de agar para su posterior análisis. Como biofilm original se muestran los valores obtenidos inicialmente durante el experimento de evolución.

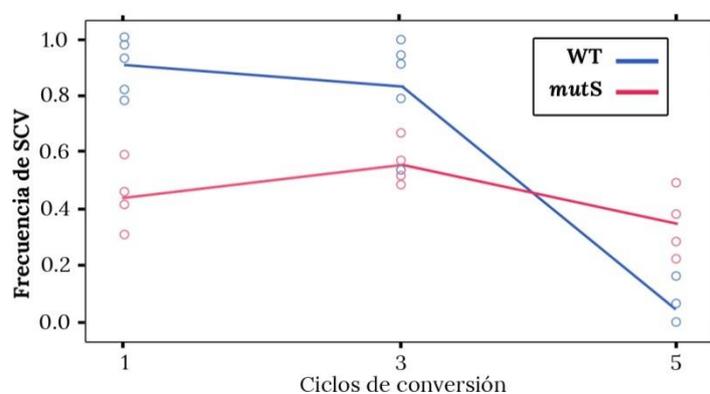


Figura R11. Frecuencia de SCV en cepas de *P. aeruginosa* normomutadoras e hipermutadoras en los ciclos 1, 3 y 5 de acuerdo al modelo lineal de efectos mixtos. El gráfico indica los valores de frecuencia de conversión al fenotipo SCV en términos de proporciones y en función de los ciclos de conversión en la cepa normomutadora WT (azul) e hipermutadora mutS (rosa). Los puntos indican los valores de proporción para cada una de las líneas evolutivas, mientras que las líneas indican las predicciones realizadas por el modelo lineal de efectos mixtos (MML: proporción de SCV ~ cepa + ciclo + cepa x ciclo + 1|línea).

En conclusión, los resultados hasta el momento obtenidos sugieren una mayor flexibilidad genética de las cepas de *P. aeruginosa* hipermutadoras para la adaptación a este esquema evolutivo experimental en relación a las líneas evolutivas obtenidas a partir del ancestro normomutador. Al mismo tiempo, estas observaciones sugieren que el proceso subyacente a la conversión y reversión al fenotipo SCV estaría basado en un mecanismo mutagénico en el cual una tasa de mutación incrementada aumentaría la probabilidad de encontrar la/s vía/s genética/s que conllevan a los eventos sucesivos de conversión y reversión y así superar las restricciones producidas a partir del ciclo 5 de evolución.

2.3. Caracterización fenotípica de las líneas evolutivas de *P. aeruginosa* obtenidas a partir del experimento de evolución.

Con el objeto de profundizar en el análisis del proceso de evolución de *P. aeruginosa* a través de los ciclos sucesivos de conversión y reversión al fenotipo SCV, se procedió a realizar una caracterización fenotípica basada en algunas de las propiedades que definen al fenotipo SCV: la motilidad mediada por flagelos o *swarming*, la producción de biofilms, el comportamiento autoagregativo y la producción de exopolisacáridos. Esta caracterización se llevó a cabo de manera comparativa entre las variantes evolucionadas en relación a sus respectivos ancestros normomutador WT0 e hipermutador *mutS0*.

En términos generales, las propiedades fenotípicas de los distintos clones con morfología SCV aislados a partir de las distintas líneas normomutadoras estuvo acompañada con un incremento en la producción de biofilms y del comportamiento autoagregativo cuando estas variantes fueron crecidas en cultivos líquidos, al mismo tiempo que evidenciaron una disminución en la motilidad tipo *swarming* y una mayor adherencia al colorante rojo Congo, indicando la pérdida del aparato flagelar y sobreproducción de exopolisacáridos Pel, respectivamente (Figura R12). La única excepción a esta descripción fue el clon WT3R5, seleccionado en el ciclo 5 de conversión de la línea WT3. Este clon, aunque forma colonias pequeñas, manifestó un aspecto liso en contraste con la rugosidad característica de todos los clones SCV restantes (Figura R12). Asimismo, no exhibió

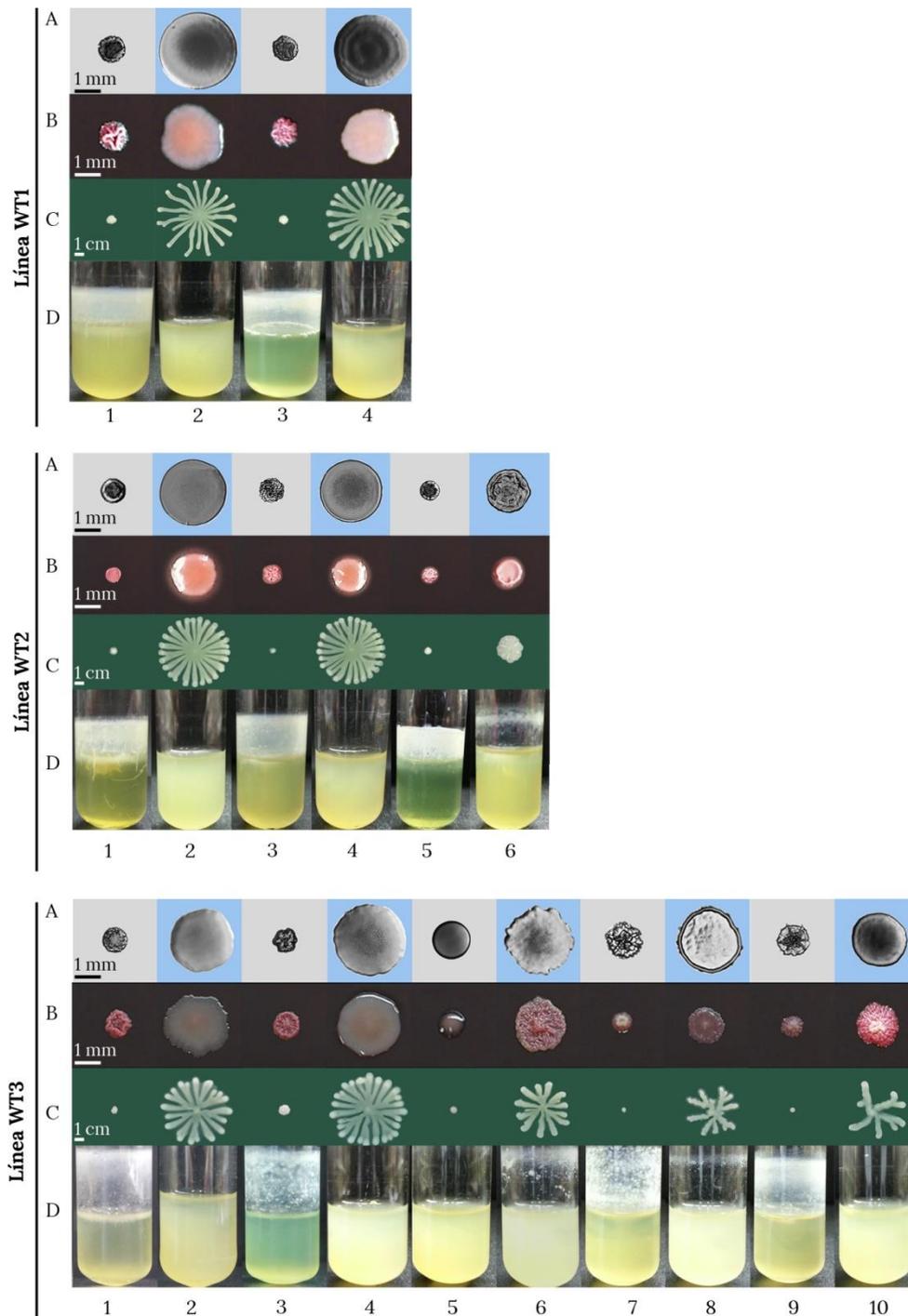


Figura R12. Caracterización fenotípica de las líneas evolutivas de *P. aeruginosa* normomutadoras. (A) Morfología de colonias en placas de agar, (B) producción de exopolisacáridos por adherencia a rojo Congo, (C) motilidad tipo swarming mediada por flagelo, (D) producción de biofilms y autoagregación. Cada una de las propiedades fenotípicas fue evaluada por triplicado. Se muestran los resultados obtenidos para las líneas evolutivas WT1, WT2 y WT3, siendo los resultados de las líneas WT4 y WT5 equivalentes. Las fotografías fueron tomadas utilizando una cámara digital Olympus XZ-1, a excepción de las morfologías de colonias en placas de agar, donde las fotografías fueron tomadas utilizando una la cámara Axiocam acoplada a un microscopio óptico directo Axioplan equipado con un objetivo Olympus 4X.

un incremento en la producción de biofilms ni en la autoagregación, y su morfología estuvo únicamente acompañada de una notable reducción del movimiento (Figura R12).

Por su lado, las variantes obtenidas durante los ciclos de reversión, mostraron en general una reversión de las propiedades fenotípicas características de las SCV, exhibiendo un comportamiento similar al ancestro WT0. Sin embargo, resulta interesante destacar que a partir del ciclo 6 en las líneas WT2 y WT3, la motilidad tipo *swarming*, desarrollado a modo de proyecciones de crecimiento que se extienden sobre la superficie de la placa de agar, estuvo claramente disminuida en relación al ancestro WT0. Específicamente, el diámetro de movimiento para el clon final de la línea WT2 fue de 3.0 ± 0.2 cm y de 6.6 ± 0.4 cm para el de la línea WT3, siendo ambos valores estadísticamente diferentes al WT0 (One way ANOVA, Tukey post-hoc, $P < 0.01$, Figuras R2 y R11). Con respecto a la producción de biofilms respecto al ancestro fue estadísticamente diferente, observándose para el clon final de la línea WT2 una mayor producción (0.69 ± 0.04 , One way ANOVA, Tukey post-hoc, $P < 0.05$) mientras que en el clon final de la línea WT3 manifestó una menor producción de biofilms respecto del ancestro WT0 (0.29 ± 0.02 , One way ANOVA, Tukey post-hoc, $P < 0.01$). En el mismo sentido, se observó una mayor unión al colorante rojo Congo principalmente en la línea WT3 respecto a la cepa ancestral. Estas observaciones sugieren que las mutaciones acumuladas durante el proceso de evolución a partir del ciclo 6 pueden ser sólo parcialmente revertidas.

Respecto a la caracterización fenotípica de las líneas evolutivas de *P. aeruginosa* fundadas a partir del ancestro hipermutador *mutS0*, se observó que la morfología SCV estuvo acompañada por el incremento en la producción de biofilms y en la autoagregación, la pérdida del movimiento mediado por flagelos y el aumento en la producción de exopolisacáridos. Notablemente, estas características distintivas del fenotipo SCV se manifestaron hasta el ciclo 15 de evolución (Figura R13).

En relación a los clones revertidos, se observó que la reversión de todas las propiedades analizadas fue clara hasta el ciclo 4 de evolución, mientras que a partir del ciclo 6 fue sólo manifestada claramente por la morfología y tamaño de la colonia y por la producción de biofilms (Figura R13-A, B y D). Así, la ida y vuelta

entre la morfología pequeña, hiperproducción de biofilms y morfología grande, baja producción de biofilms, en los ciclos de conversión y reversión, respectivamente, fue claramente manifestada hasta el ciclo 16 de evolución. Sin embargo, la reversión del movimiento tipo *swarming*, la autoagregación (mediada por pilis y fimbrias) y la adherencia al rojo Congo fue parcial a partir del ciclo 6 de evolución. Particularmente respecto al *swarming* y tal como se observa en la Figura R13-C, si bien el mismo fue mayor en comparación con las variantes SCV, los clones revertidos hipermutadores no desarrollaron el crecimiento a modo de dendritas característico y el diámetro de la extensión del movimiento fue significativamente menor y estadísticamente diferente en comparación con el ancestro hipermutador *mutS0* (0.93 ± 0.035 cm, One way ANOVA, Tukey post-hoc, $P < 0.001$). De esta manera, el proceso de evolución producido hasta el ciclo 5 determinaría la alteración de las funciones relacionadas con la motilidad y la adherencia de las bacterias, las cuales no podrían ser totalmente restablecidas en los eventos de reversión subsiguientes.

Este fenómeno de reversión parcial puede estar relacionado al esquema evolutivo planteado, en el cual el mantenimiento de ciertas propiedades facilitaría la conversión en los ciclos subsiguientes mientras que la reversión en sólo alguna de ellas sería suficiente para la adaptación a las condiciones de adaptación impuestas en los ciclos de reversión. Como una explicación alternativa, es posible que la alteración por acumulación de mutaciones de ciertas funciones, tales como la motilidad, sea de carácter permanente y la bacteria no encuentra o no tenga recursos a nivel genético para poder compensarlas.

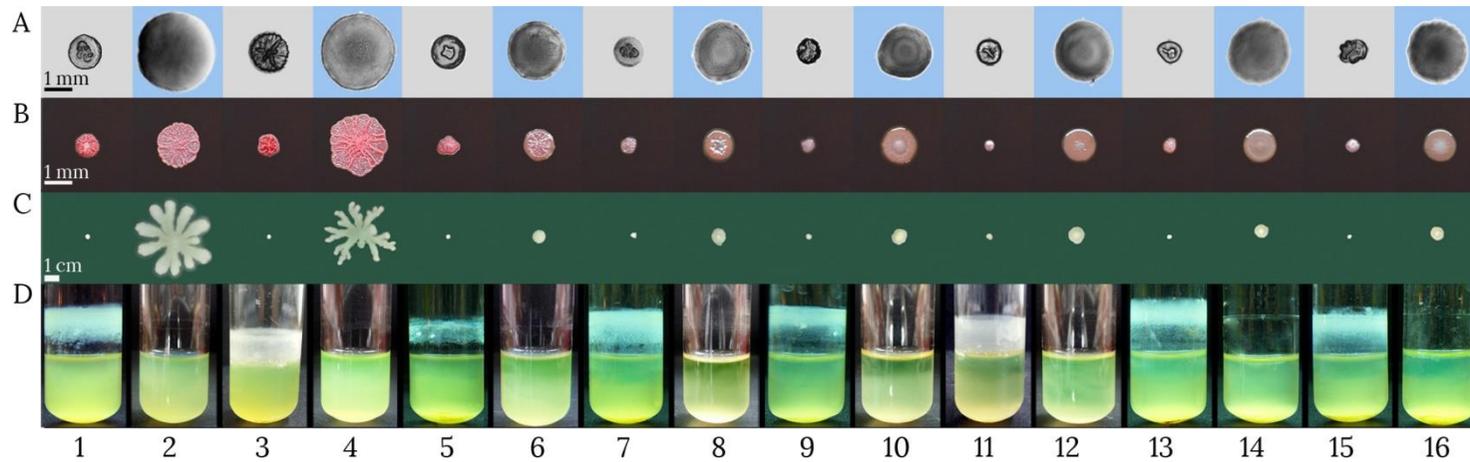


Figura R13. Caracterización fenotípica de la línea evolutiva de *P. aeruginosa* hipermutadora *mutS1*. (A) Morfología de colonias en placas de agar, (B) producción de exopolisacáridos por adherencia al colorante rojo Congo, (C) motilidad tipo swarming mediada por flagelo, (D) producción de biofilms y autoagregación. Cada una de las propiedades fenotípicas fue evaluada por triplicado. Los resultados de las líneas evolutivas *mutS2*, *mutS3* y *mutS4* fueron equivalentes. Las fotografías fueron tomadas utilizando una cámara digital Olympus XZ-1, a excepción de las morfologías de colonias en placas de agar, donde las fotografías fueron tomadas utilizando una la cámara Axiocam acoplada a un microscopio óptico directo Axioplan equipado con un objetivo Olympus 4X. Los ciclos de conversión y reversión al fenotipo SCV se denotan con barras grises o celestes, respectivamente. Los números indican los ciclos evolutivos sucesivos.

CAPÍTULO III: BASES MOLECULARES DE LA CONVERSIÓN Y REVERSIÓN AL FENOTIPO SCV EN PSEUDOMONAS AERUGINOSA MEDIANTE ESTUDIOS DE GENÓMICA ESTRUCTURAL COMPARATIVA

En el Capítulo anterior se describió el diseño de un modelo de evolución experimental, el cual permitió el estudio de la conversión y reversión al fenotipo SCV de *P. aeruginosa* en forma repetida y sucesiva y de manera comparativa entre cepas normomutadoras e hipermutadoras. Así, se procedió a la obtención de cinco líneas evolutivas fundadas a partir de un ancestro normomutador y cuatro fundadas a partir del ancestro hipermutador. Cuando estas líneas fueron paralelamente ensayadas, se pudo confirmar que el mecanismo de conversión y reversión SCV fue notablemente favorecido por el incremento en la tasa de mutación en las líneas hipermutadoras (Figura R9 y R10). En ese sentido, mientras las líneas normomutadoras mostraron una frecuencia de conversión elevada en los primeros ciclos de evolución, se observó una clara restricción en la emergencia de SCV en el ciclo 5, a partir del cual la frecuencia disminuyó de manera significativa y tan sólo una de las líneas estudiadas logró adaptarse a lo largo de 10 ciclos de evolución sucesivos. Por el contrario, las 4 líneas evolutivas hipermutadoras mostraron una elevada tasa de conversión y reversión SCV a lo largo de 16 ciclos evolutivos sucesivos sin mostrar ningún tipo de restricción, indicando una mayor flexibilidad genética en el esquema evolutivo impuesto. Estas diferencias sugieren que el fenómeno de conversión/reversión SCV estaría basado en la ocurrencia de mutaciones y que existirían diferentes vías génicas alternativas y/o redundantes a través de las cuales la bacteria puede adaptarse al proceso.

Con el objeto de determinar las bases moleculares implicadas en la adaptación de *P. aeruginosa* a la conversión y reversión SCV de forma sucesiva, a continuación se procedió a la obtención y al análisis de secuencias de genomas pertenecientes a clones evolucionados y a sus respectivos ancestros. Con esta aproximación experimental se pretendió responder los siguientes interrogantes: i) ¿cuál es la base molecular que permite la conversión y reversión SCV?; ii) ¿cuáles son los genes implicados en este fenómeno?; iii) ¿se produce a través de mutaciones compensatorias o a través de la ocurrencia y reversión de una misma

mutación (“switch on/off mutations”)?; iv) ¿Cuál es la causa de la restricción genética en cepas normomutadoras? A continuación, se exponen los resultados obtenidos que intentan responder las preguntas planteadas.

3.1. Análisis de la base molecular de la conversión y reversión SCV sucesiva mediante genómica comparativa.

Con el fin de investigar el mecanismo de conversión y reversión al fenotipo SCV a nivel molecular, se procedió al secuenciamiento de los genomas completos de los clones de *P. aeruginosa* finales más evolucionados de cada línea normomutadora descrita y el secuenciamiento de clones finales e intermedios de las líneas hipermutadoras (Figura R14, ver Materiales y Métodos, Tabla M3). Paralelamente, se obtuvieron las secuencias genómicas correspondientes a los ancestros normomutador e hipermutador, con el propósito de determinar las mutaciones acumuladas durante transcurso del esquema evolutivo. Para ello, se utilizó la tecnología *Next Generation Sequencing* (NGS) mediante el uso de la plataforma Illumina. Esta tecnología, junto al análisis bioinformático complementario, permitió detectar mutaciones del tipo inserciones o deleciones (indels) y polimorfismos de nucleótido único (SNP, por sus siglas del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) acumulados en los distintos genomas en relación a los ancestros (ver Materiales y Métodos).

Para ello, a partir de cada clon seleccionado (Figura R14), se procedió a la extracción de ADN genómico, la construcción de las librerías genómicas y el secuenciamiento propiamente dicho (ver Materiales y Métodos). El análisis bioinformático incluyó la identificación de mutaciones, mediante el alineamiento de las lecturas obtenidas para cada uno de los genomas secuenciados y el genoma de la cepa de referencia *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 [52]. Las diferencias entre ambos fueron determinadas, filtradas y anotadas, obteniéndose como resultado una lista de mutaciones para cada genoma y sus posiciones con respecto a la referencia. Mediante el alineamiento de las lecturas obtenidas de cada uno de los ancestros con respecto al genoma de referencia se determinaron potenciales polimorfismos, los cuales fueron restados y descartados del análisis global, de

manera de estudiar exclusivamente las variaciones genómicas involucradas durante el desarrollo del experimento de evolución.

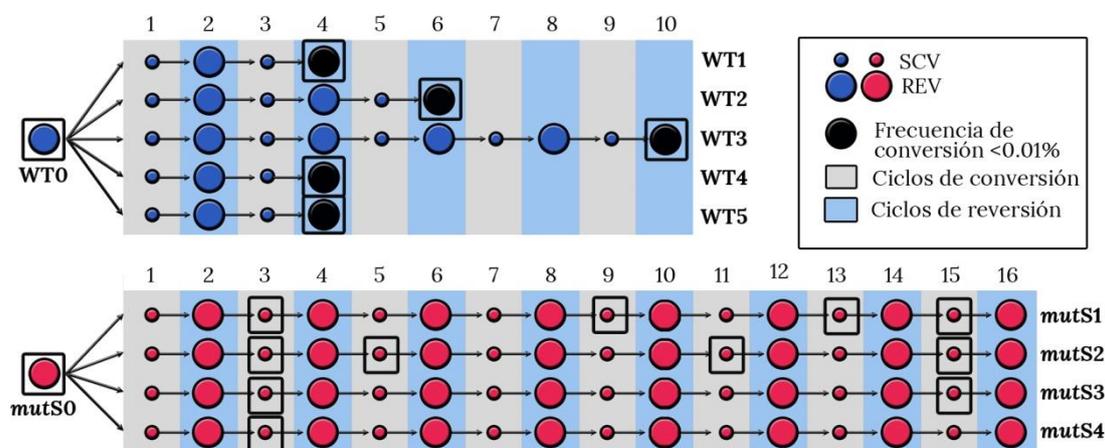


Figura R14. Clones de *P. aeruginosa* normomutadores e hipermutadores obtenidos del ensayo de evolución y seleccionados para el secuenciamiento de genomas. Con cuadrados negros se destacan los clones WT y mutS que fueron seleccionados para el secuenciamiento de genomas. Para el caso de las 5 líneas normomutadoras, se seleccionaron los clones finales para los cuales la frecuencia de conversión al morfotipo SCV fue menor al 0.01% (círculos negros) así como al ancestro normomutador (WT0). Para el caso de las 4 líneas mutS, se seleccionaron clones intermedios junto con el ancestro hipermutador (mutS0). Los ciclos de conversión y reversión al fenotipo SCV se denotan con barras grises o celestes, respectivamente. Los círculos pequeños señalan colonias SCV, mientras los círculos grandes refieren a las variantes revertidas. Los números indican cada ciclo evolutivo sucesivo.

3.2. Análisis de las líneas evolutivas de *P. aeruginosa* derivadas del ancestro normomutador.

El análisis de las secuencias genómicas de los clones de *P. aeruginosa* normomutadores, evidenció la acumulación de una serie de mutaciones no sinónimas así como pequeñas y grandes deleciones. La ocurrencia de cada una de las mutaciones fue confirmada en los clones finales y en el ancestro WT0, a través de la amplificación por PCR y su posterior secuenciamiento directo. Mediante el uso de los algoritmos SNPeff [184] y SIFT [185], se logró predecir que el efecto de las mutaciones analizadas es de moderado a alto, sugiriendo que en todos los casos la función de las proteínas codificadas por los genes alterados se veía afectada. En la Tabla R3 se detalla la lista de mutaciones confirmadas para cada una de las líneas.

Tabla R3. Mutaciones acumuladas en las líneas evolutivas normomutadoras en relación al ancestro WT0

Línea	Locus	Gen	Mutación ¹	SNPeff ²	SIFT ³	Ciclo ⁴
WT1	PA14 _49890 [#]	yfiN	T119C (V40A)	Moderado	Tolerada	1
	PA14 _49890	yfiN	G138A (R46H)	Moderado	Afectada	2
	PA14 _16480	wspF	ΔG289	Alto	-	3
	PA14 _16450	wspC	A47G (D16G)	Moderado	Tolerada	4
WT2	PA14 _49880	yfiR	A341G (Y114C)	Moderado	Afectada	1
	PA14 _49880-910	yfiNB	ΔyfiN ₁₁₆₅ -PA14_49920 ₃₃₀	Alto	-	2
	PA14 _16480	wspF	C895T (Q299*)	Alto	-	3
	PA14 _16470	wspE	T1074G (D358E)	Moderado	Afectada	4
	PA14 _72420		Δ1295-1310	Alto	-	5
	PA14 _60870	morA	G2551T (E851*)	Alto	-	6
WT3	PA14 _16430	wspA	G1357A (V453I)	Moderado	Tolerada	1
	PA14 _16500	wspR	ΔC929	Alto	-	2
	PA14 _49890	yfiN	G231A (E87K)	Moderado	Tolerada	3
	PA14 _49890	yfiN	Δ156-209	Alto	-	4
	PA14 _60870	morA	T3423C (F1142L)	Moderado	Afectada	6
	PA14 _60810	nfxB	A564C (*188C)	Alto	-	7
	PA14 _60870	morA	C2994A (A999T)	Moderado	Afectada	8
	PA14 _60870	morA	A1687C (T563P)	Moderado	Afectada	9
	PA14 _60870	morA	C2982T (R995C)	Moderado	Afectada	10
	WT4	PA14 _49880	yfiR	T181C (W61R)	Moderado	Afectada
PA14 _49890		yfiN	A112C (T38P)	Moderado	Afectada	2
PA14 _16430		wspA	C1001T (A334V)	Moderado	Afectada	3
PA14 _16430		wspA	ΔG 135	Alto	-	4
WT5	PA14 _16430	wspA	C1232T (A411V)	Moderado	Afectada	1
	PA14 _16500	wspR	Δ162-168	Alto	-	2
	PA14 _49900	yfiB	T128A (L43H)	Moderado	Afectada	3
	PA14 _49890	yfiN	A112C (T38P)	Moderado	Afectada	4

¹Entre paréntesis se indican los cambios a nivel de aminoácidos. El asterisco indica la presencia de un codón de terminación. El símbolo Δ indica una mutación de tipo deleción. En negrita se indica que la mutación ha sido previamente descrita en clones de *P. aeruginosa* aislados a partir de muestras de esputo de pacientes con FQ [186].
²Predicción bioinformática del efecto de la mutación sobre la expresión del gen utilizando el algoritmo SNPeff [184].
³Predicción bioinformática del efecto de una mutación en la función de la proteína utilizando el algoritmo SIFT [185].
⁴Ciclo evolutivo en el cual se determinó que la mutación fue adquirida. [#]tpbB según la actualización de la anotación correspondiente al 20 de Enero del 2017.

El espectro de mutación estuvo sesgado por transiciones (47.5%), seguido por un porcentaje menor de transversiones e indels (25% y 27.5%, respectivamente). Asimismo, el número de mutaciones acumuladas en cada línea fue coincidente con el número de ciclos sufridos en el proceso de evolución, con la única excepción de la línea WT3, la cual avanzó hasta el ciclo 10 de reversión a través de la acumulación de un total de 9 mutaciones.

A continuación, con el objetivo de analizar la historia mutacional, es decir, el orden en el que cada mutación fue adquirida a lo largo del esquema evolutivo, se procedió a realizar reacciones de amplificación por PCR de los fragmentos que contenían las distintas mutaciones y su secuenciamiento directo. Para ello, como

templado de cada reacción se utilizó ADN genómico obtenido a partir de cada una de las variantes correspondientes a las distintas líneas evolutivas. Así, se pudo confirmar que las mutaciones descritas se acumulaban de a una por ciclo evolutivo, o dicho de otro modo, a una frecuencia igual a 1 mutación por ciclo de conversión o reversión (Tabla R3, Figura R15).

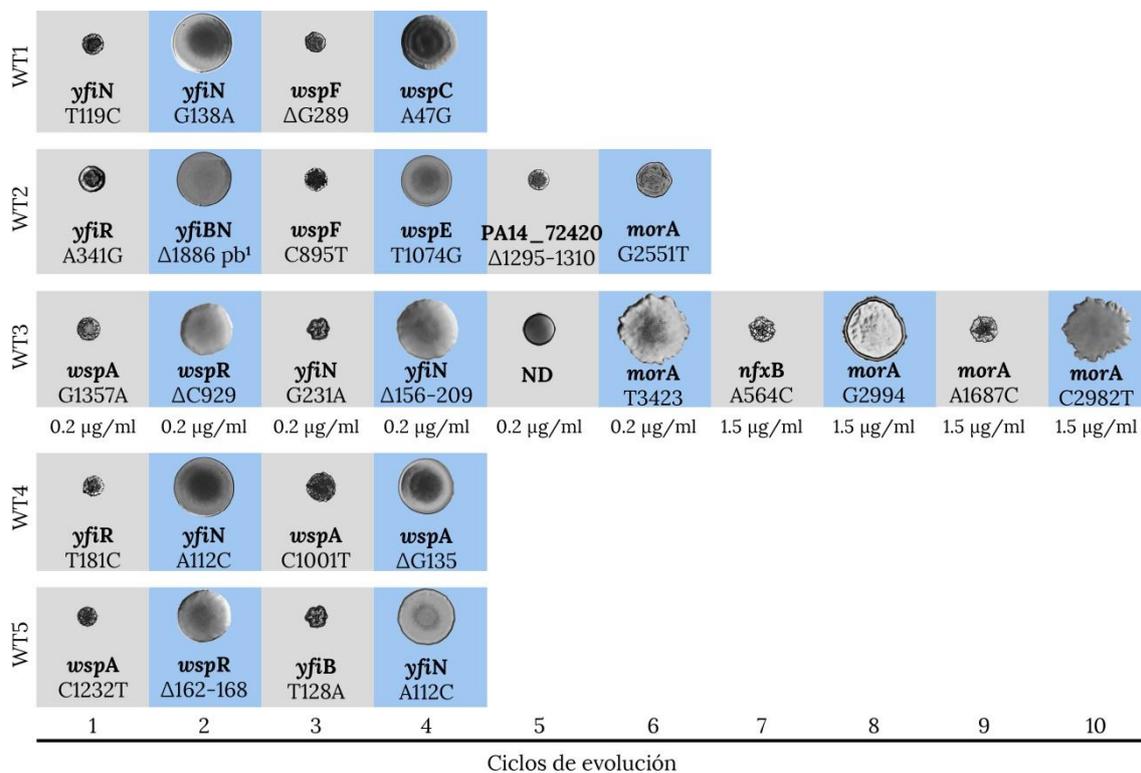


Figura R15. Mutaciones acumuladas en las 5 líneas normomutadoras. Las mutaciones fueron determinadas mediante el análisis de genómica comparativa y el análisis de la historia mutacional a través de la amplificación por PCR y secuenciamiento directo de cada una de ellas en todos los clones de la línea evolutiva correspondiente. La morfología de colonias se detalla junto a la mutación acumulada en cada ciclo de evolución. En negrita se describe el nombre del gen y por debajo la sustitución observada en la secuencia de ADN. En la línea WT3 se señala por debajo las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) a ciprofloxacina de cada clon, notándose un incremento a partir del ciclo 7 (ver más adelante). ND no determinada. Los ciclos de conversión y reversión al fenotipo SCV se denotan con barras grises o celestes, respectivamente. Los números indican el orden de los ciclos sucesivos. ¹Corresponde a la delección ΔyfiN₁₁₆₅ - PA14_49920₃₃₀.

En todos los casos, las mutaciones estuvieron localizadas en genes relacionados al metabolismo del segundo mensajero bacteriano 3',5'-diguanylate cíclico (c-di-GMP) (Tabla R3, Figura R16-B). Recientemente y durante el transcurso de este trabajo de tesis, se publicaron trabajos científicos que permiten postular

que el c-di-GMP es la principal molécula que mediaría la transición entre los estilos de vida en biofilms y planctónicos (Figura R16-A) [187-189]. En este contexto, se ha determinado que los cultivos en biofilms exhiben elevados niveles de c-di-GMP, mientras que los cultivos planctónicos, y de células en dispersión, muestran niveles disminuidos de este segundo mensajero [188]. El modelo propuesto hasta el momento indica que el c-di-GMP funcionaría como una molécula señal cuya concentración intracelular, junto con la participación de genes específicos, dirigiría cada una de las etapas del ciclo de formación de biofilms [97,187,188,190-192]. Tal como se esquematiza en la Figura R16-B, los niveles de c-di-GMP intracelulares resultarían del balance entre la síntesis y degradación del metabolito. La síntesis está a cargo de enzimas denominadas diguanilato ciclasas (DGC), las cuales utilizan 2 moléculas de GTP para producir el c-di-GMP, mientras que la degradación la catalizan enzimas denominadas fosfodiesterasas (FDE), las cuales producen a partir de este mensajero pGpG y posteriormente a GMP. Ambas enzimas poseen dominios catalíticos altamente conservados y que las definen, de forma tal que las DGC poseen el dominio GGDEF en el sitio activo, mientras las FDE poseen o bien, el dominio EAL o el HD-GYP [193,194]. Sin embargo, los dominios GGDEF y EAL pueden estar formando parte de la misma proteína, constituyendo las llamadas proteínas híbridas o de actividad dual [187,195-198].

Dentro de las funciones reguladas por este segundo mensajero se incluyen tres categorías de procesos: la motilidad, la producción de exopolisacáridos y la adherencia, de forma tal que niveles intracelulares bajos favorecen la motilidad por *swarming*, mientras que niveles elevados promueven la adherencia y la expresión de la matriz extracelular del biofilm [188].

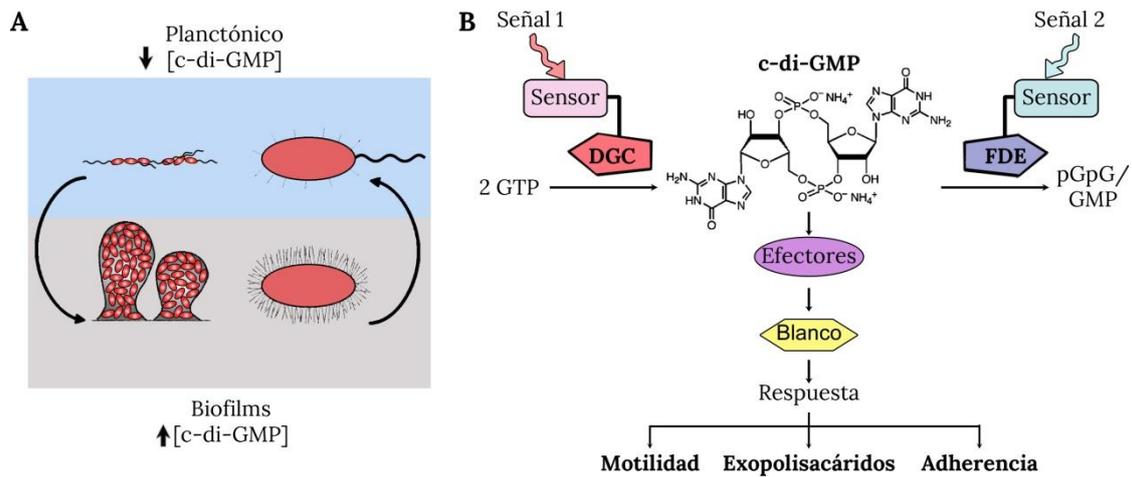


Figura R16. El segundo mensajero bacteriano c-di-GMP. (A) Los niveles intracelulares del c-di-GMP permiten la transición entre los estadios de vida en biofilm (altas) y planctónico (bajas). En los procesos de formación y dispersión de biofilms, se producen consecutivamente eventos conversión (barras grises) y reversión (barras celestes) de los fenotipos a él adaptados. (B) Esquema general de la producción y degradación del c-di-GMP y las enzimas implicadas: diguanilato ciclasas (DGC) y fosfodiesterasas (FDE). En la parte inferior se destacan los procesos celulares que estarían modulando en respuesta a los niveles del c-di-GMP en las células bacterianas. Modificado de Hengge y col, 2016 [196].

El hecho de que el modelo evolutivo impuesto estuvo basado en eventos de conversión a un fenotipo característico y adaptado al crecimiento en biofilms y en eventos de reversión a un fenotipo similar al silvestre que readquiere características propias de una vida planctónica, los resultados obtenidos indicaban que las mutaciones acumuladas en cada ciclo estarían regulando el incremento y la disminución consecutiva de los niveles de c-di-GMP. Estas variaciones serían responsables las variaciones fenotípicas observadas en cada ciclo de evolución.

En concordancia con esta hipótesis, el análisis de la historia mutacional de cada una de las cinco líneas normomutadoras, demostró que la conversión/reversión al fenotipo SCV, se basó en mutaciones en genes que codifican para DGC o enzimas híbridas DGC/FDE, o bien codifican para genes que regulan la actividad de las mismas (ver más adelante). Particularmente, durante los primeros cuatro ciclos de evolución se observaron en todos los casos mutaciones en los sistemas de transducción de señales *wsp* e *yfi*. Estas mutaciones se acumularon en un orden tal que, ocurrida una mutación en un sistema de transducción, la subsiguiente mutación sucedía en el mismo sistema, ya sea en el mismo gen o en un gen diferente, siguiendo un modo compensatorio (Tabla R3, Figura R15). Así, y tomando a modo de ejemplo la línea WT1, la conversión y

reversión en los ciclos 1 y 2 estuvieron basadas en mutaciones en el sistema *yfi*, mientras que en los ciclos subsiguientes 3 y 4 afectaron al sistema *wsp* (Tabla R3, Figura R15).

En base a estas observaciones, y con el objeto de analizar si las mutaciones estarían afectando la regulación de dichas enzimas, incrementando o disminuyendo los niveles de c-di-GMP en los ciclos de conversión y reversión, respectivamente, se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales: i) la cuantificación directa del c-di-GMP mediante nanoHPLC-masa; ii) ensayos de complementación mediante la sobreexpresión de los genes *wspR* y PA2133, los cuales codifican para una DGC y una FDE, respectivamente (ver Materiales y Métodos).

La cuantificación directa del c-di-GMP se llevó a cabo en los clones pertenecientes a la línea WT1, mediante cromatografía líquida de alta “performance” través de la tecnología nano-HPLC acoplada a un espectrómetro de masa (ver Materiales y Métodos). Como se detalla en la Figura R17, la morfología SCV perteneciente a los clones WT1R1 y 3, estuvo acompañada de una concentración de c-di-GMP significativamente mayor en relación a las variantes revertidas WT1R2 y 4, cuyos valores fueron tan bajos, que dificultaron incluso su cuantificación. Estas diferencias en la concentración de c-di-GMP no sólo acompañaron a la morfología de colonias, sino también a la capacidad formadora de biofilms (Figura R17).

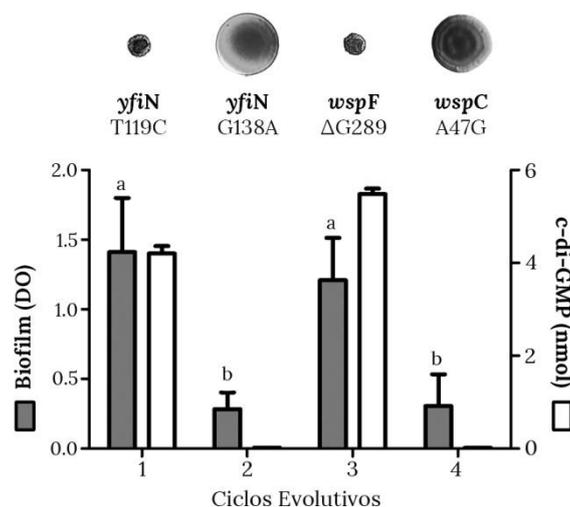


Figura R17. Cuantificación de c-di-GMP y producción de biofilms observada en la línea evolutiva de *P. aeruginosa* WT1. En la parte superior se muestra la morfología de colonias en placas de agar y por debajo se detalla la mutación determinada para cada clon en términos de secuencia de ADN. En el gráfico inferior, las barras grises muestran los valores de absorbancia (DO) obtenida para la determinación de la producción de biofilms por la técnica de cristal violeta. Las barras blancas indican la cuantificación del c-di-GMP determinada mediante nano-HPLC-masa ($\lambda=280\text{nm}$) expresada en nanomoles (nmol) relativos al peso seco de los extractos. Se expresa la media \pm el desvío estándar, las letras diferentes indican significancia estadística (One way ANOVA, Tukey post-hoc, $P<0.05$).

A continuación, se realizaron experimentos de sobreexpresión de una FDE y una DGC, con el propósito de modular de manera artificial los niveles de c-di-GMP en los clones obtenidos durante el experimento de evolución. Para ello se utilizó el plásmido pJN2133 [199] y se construyó el pJNwspR (ver Materiales y Métodos), los cuales codifican para la FDE PA2133 y la DGC WspR, respectivamente. Ambos plásmidos derivan del pJN105 [200], el cual posee un promotor inducible por arabinosa y permiten controlar los niveles de expresión del gen clonado. De esta manera, se procedió a la determinación de las propiedades fenotípicas de las SCV transformadas con el plásmido pJN2133 (Figura R18), y de las variantes revertidas transformadas con el plásmido pJNwspR (Figura R19), utilizando el vector pJN105 como control en ambos casos.

Tal como se observa en la Figura R18, cuando las variantes SCV transformadas con el plásmido pJN2133 fueron crecidas en presencia de arabinosa, condición que induce la sobreexpresión del gen de la FDE, adquirieron una morfología de colonias y una capacidad de formación de biofilms similar a la ancestral, indicando que la complementación del fenotipo se estaría produciendo

por una disminución de los niveles de c-di-GMP basados en la actividad degradadora de la enzima. La única excepción fue el clon WT3R5, en el cual la sobreexpresión de la FDE no produjo cambios a nivel morfológico ni en relación a la formación de biofilms y autoagregación (ver más adelante).

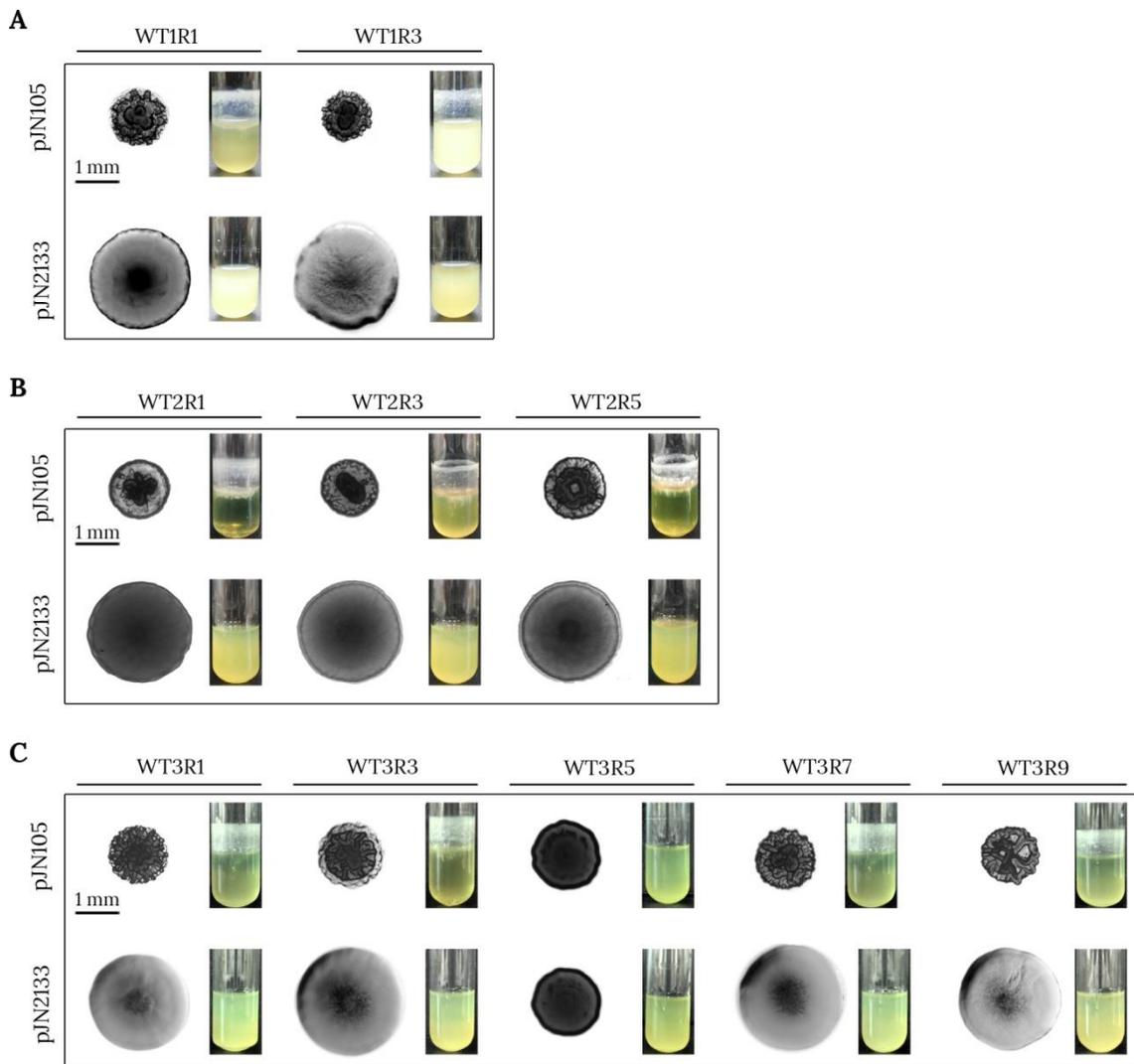


Figura R18. Ensayos de complementación del fenotipo SCV mediante la sobreexpresión de la FDE codificada por el gen PA2133. Morfología de colonias y comportamiento en cultivos líquidos de las variantes SCV pertenecientes a las líneas evolutivas WT1 (A), WT2 (B) y WT3 (C). En cada uno de los casos, se detalla los resultados obtenidos al sobreexpresar la FDE codificada por el gen PA2133 mediante la transformación con el plásmido pJN2133 y el fenotipo resultante de la transformación con el vector pJN105, utilizado como control. Los resultados obtenidos para las líneas WT4 y WT5 fueron equivalentes. R1, R3, R5, R7 y R9 definen a cada clon de acuerdo al ciclo de evolución en el que fue aislado.

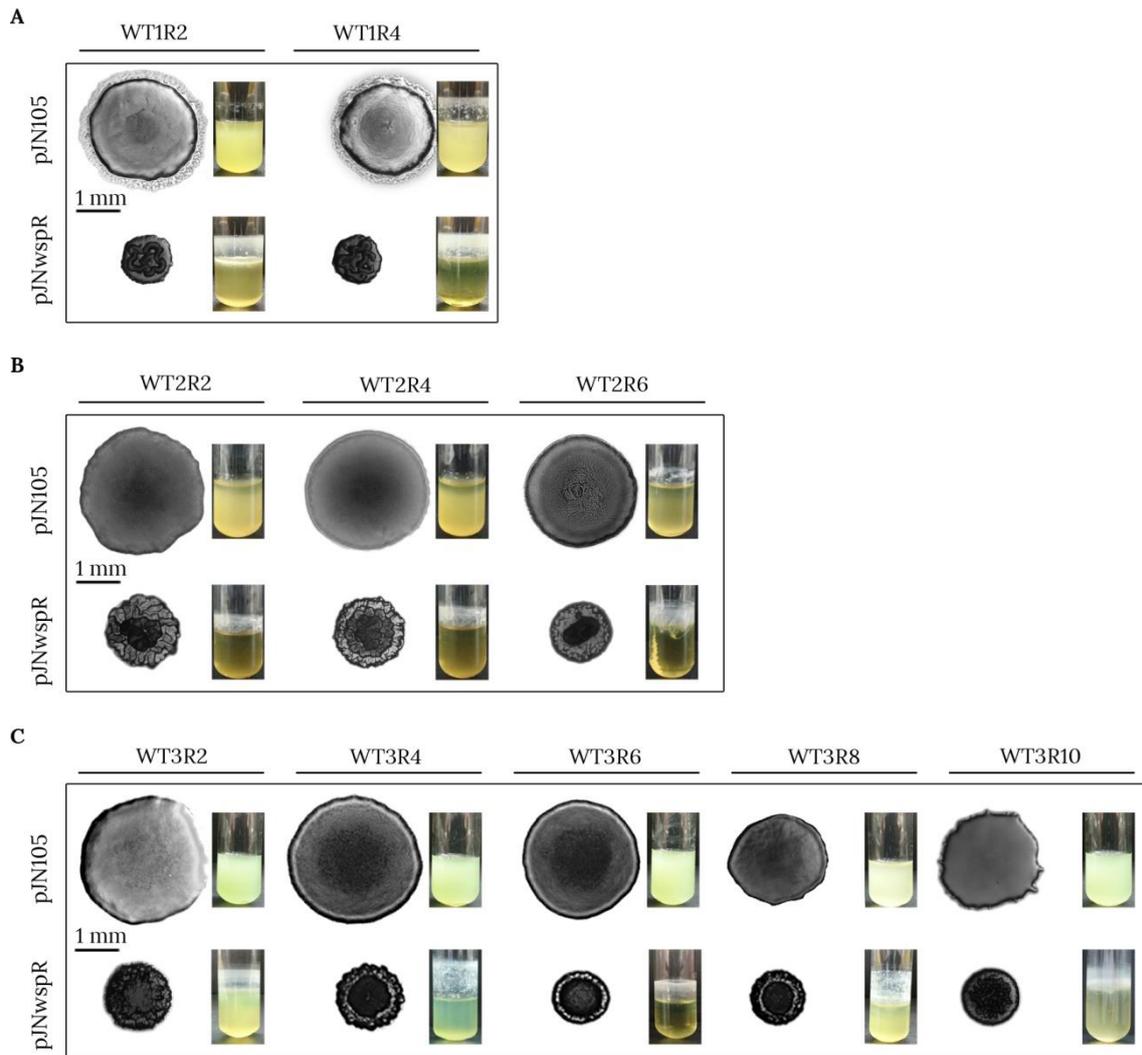


Figura R19. Ensayos de complementación del fenotipo revertido mediante la sobreexpresión de la DGC WspR. Morfología de colonias y comportamiento en cultivos líquidos de las variantes revertidas obtenidas a partir de las líneas WT1 (A) WT2 (B) y WT3 (C). En cada uno de los casos, se detalla los resultados obtenidos al sobreexpresar la DGC codificada por el gen *wspR* mediante la transformación con el plásmido pJNwspR y el fenotipo resultante de la transformación con el vector pJN105, utilizado como control. Los resultados obtenidos para las líneas WT4 y WT5 fueron equivalentes. R2, R4, R6, R8 y R10 definen a cada clon de acuerdo al ciclo de evolución en el que fue aislado.

Como contrapartida, cuando la DGC WspR fue sobreexpresada en las variantes revertidas, las mismas adquirieron una morfología de colonia pequeña con aspecto rugoso e hiperadherente característico de las colonias SCV, mientras que su capacidad de formación de biofilms aumentó significativamente, propiedades que se obtuvieron a consecuencia del incremento en los niveles de c-di-GMP producidos por la actividad de la enzima (Figura R19). Los ensayos de complementación fueron llevados a cabo con el total de las líneas evolutivas WT,

observándose en todos los casos la reversión de las variantes SCV mediante la sobreexpresión de la FDE PA2133 y la conversión de las variantes revertidas mediante la sobreexpresión de la DGC WspR. Los resultados obtenidos indican que las mutaciones adquiridas en el transcurso de la evolución producirían, de manera compensatoria, el incremento y la disminución de los niveles de c-di-GMP en los sucesivos ciclos de conversión y reversión SCV, respectivamente.

3.2.1. Línea evolutiva WT1.

Como se mencionó anteriormente, los primeros cuatro ciclos de evolución estuvieron basados en mutaciones en los sistemas *wsp* e *yfi* (Figura R14). El sistema de transducción de señales *yfi* (Figura R20-A, Figura R21-A) es un complejo formado por tres proteínas: YfiB, la cual se encuentra anclada a membrana externa y actúa como un receptor del sistema; el represor YfiR que se encuentra en el espacio periplásmico; y la DGC YfiN que se localiza en la membrana citoplasmática [186]. Por su parte, el sistema de transducción *wsp* (Figura R20-B y R20-B) está conformado por la proteína receptora WspA, la cual se encuentra anclada a la membrana citoplasmática y que frente a señales medioambientales específicas modula la autofosforilación de la histidín quinasa WspE; la DGC WspR; metiltransferasa WspC y la metilesterasa WspF con funciones antagónicas, y las proteínas estructurales WspB y WspD [126].

La línea evolutiva WT1, la cual se adaptó al modelo evolutivo durante 4 ciclos, mostró la presencia de 4 mutaciones (Tabla R3, Figura R15 y R20). Todas ellas tendrían un efecto de moderado a alto en la función de las respectivas proteínas de acuerdo a la predicción bioinformática realizada por el algoritmo SNPeff (Tabla R3). La variante SCV1, denominada WT1R1, adquirió una sustitución no sinónima de cambio de sentido en el gen *yfiN*. Así, la sustitución de la Timina por una Citosina en la posición 119 (T119C), genera el cambio del aminoácido Valina por una Alanina en la posición 40 de la proteína (V40A), que compromete el dominio PAS de la DGC *yfiN*. Este dominio forma parte de la porción N-terminal conservada y está comprendido entre los aminoácidos 35 a 161 [201]. El dominio PAS interacciona con YfiR, de tal forma que la ausencia del represor se transduce como una señal que activa al dominio GGDEF. Cabe destacar que esta mutación ha

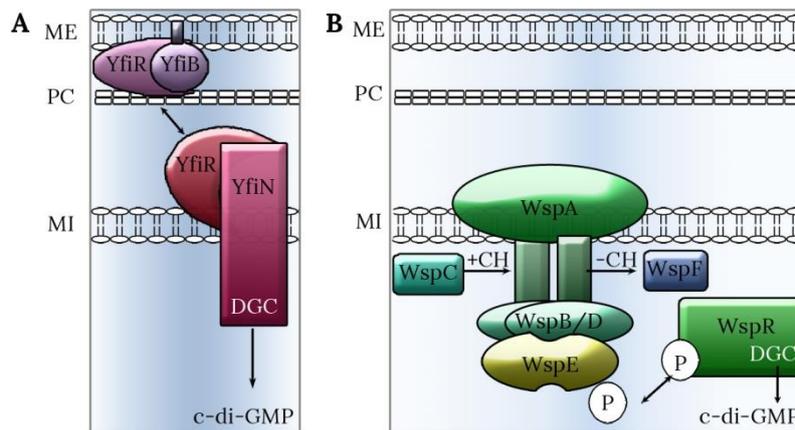


Figura R20. Los sistemas de transducción de señales Yfi y Wsp de *P. aeruginosa*. (A) Modelo de interacción del complejo yfiBNR. La DGC YfiN se encuentra localizada en membrana interna (MI) y su actividad está controlada por el represor periplásmico YfiR. A su vez, YfiB es una proteína receptora de membrana externa (ME) que activa a YfiN mediante el secuestro de YfiR. En estas condiciones, YfiN cambia su conformación, se activa y cataliza la síntesis del c-di-GMP. (B) Modelo de interacción del complejo wspABCDEFR. WspA es la proteína receptora que se localiza en membrana interna y detecta una señal de activación asociada al crecimiento celular sobre superficies. La señal es transducida a WspE, la cual cataliza la fosforilación del regulador de respuesta WspR, el cual a través de su actividad DGC, sintetiza el segundo mensajero c-di-GMP. Las proteínas antagonistas WspC (metiltransferasa) y WspF (metilesterasa) están involucradas en la adaptación a la señal, mientras WspB y WpsD son proteínas de andamio importantes para la función y correcta localización del complejo. Modificado de Malone y col, 2012 y O'Connor y col, 2012 [186,202].

sido descrita anteriormente como responsable del aumento de la adherencia observada en clones de *P. aeruginosa* aislados a partir de muestras de esputo de pacientes con FQ. En este trabajo proponen que la proteína mutante YfiN V40A se encuentra constitutivamente activa y es insensible a la regulación por el represor [186]. Más aún, según la predicción realizada por SIFT (Tabla R3), esta mutación sería tolerada en cuanto a la función enzimática, sugiriendo un efecto activador de esta mutación que permitiría explicar el incremento de los niveles de c-di-GMP en el clon WT1R1. En el ciclo subsiguiente de reversión, el clon WT1R2 adquirió una nueva mutación en el gen *yfiN*, ubicada muy cerca a la ocurrida en el ciclo anterior. Esta sustitución G138A genera el cambio de los aminoácidos R46H en el dominio PAS de la proteína, por lo que podría estar restituyendo la posibilidad de unión con el represor YfiR, permitiendo que el sistema de transducción vuelva a un estado inactivo y los niveles intracelulares de c-di-GMP disminuyan. Esta mutación no ha sido descrita previamente en la bibliografía. Seguidamente, en el clon WT1R3 se determinó la presencia de una delección de una Guanina en la posición 289 ($\Delta G289$)

del gen *wspF*, la cual produce un corrimiento en el marco de lectura y la generación de un codón de terminación prematuro en la posición 101 de la secuencia de aminoácidos. La consecuencia de esta mutación es una proteína *wspF* trunca donde los 234 aminoácidos finales, que contienen el dominio metilesterasa (ME), no llegan a sintetizarse. En esta situación, el receptor WspA se encontraría hipermetilado por la metiltransferasa WspC, generando que el sistema este constitutivamente activo y los niveles de c-di-GMP sean elevados. Previamente, se han reportado que los clones de *P. aeruginosa* que contienen una inserción de un transposón o una deleción completa del gen *wspF*, exhiben una morfología de colonias y propiedades fenotípicas SCV [126,199]. De este modo, resulta claro el mecanismo mediante el cual este clon pudo volver a adaptarse y elevar los niveles de c-di-GMP. Finalmente, esta mutación fue compensada en el clon WT1R4 a través de una sustitución (A47G) en *wspC*, de función antagónica a *wspF*, la cual genera el cambio del Ácido Aspártico (D) por una Glicina (G) en la posición 16 (D16G) del dominio metiltransferasa de la proteína (Figura R21-B). Si bien la predicción realizada por el algoritmo SIFT determinó que este cambio sería tolerado, su localización sugiere que podría afectar los niveles de metilación del receptor WspA, disminuyendo la señalización del sistema de transducción *wsp* y consecuentemente la actividad de la DGC WspR. En concordancia con esta idea, se ha descrito previamente que la deleción del gen *wspC* en *P. aeruginosa*, e incluso en su ortólogo correspondiente en *P. putida*, anula la señalización mediada por este sistema de transducción [202,203].

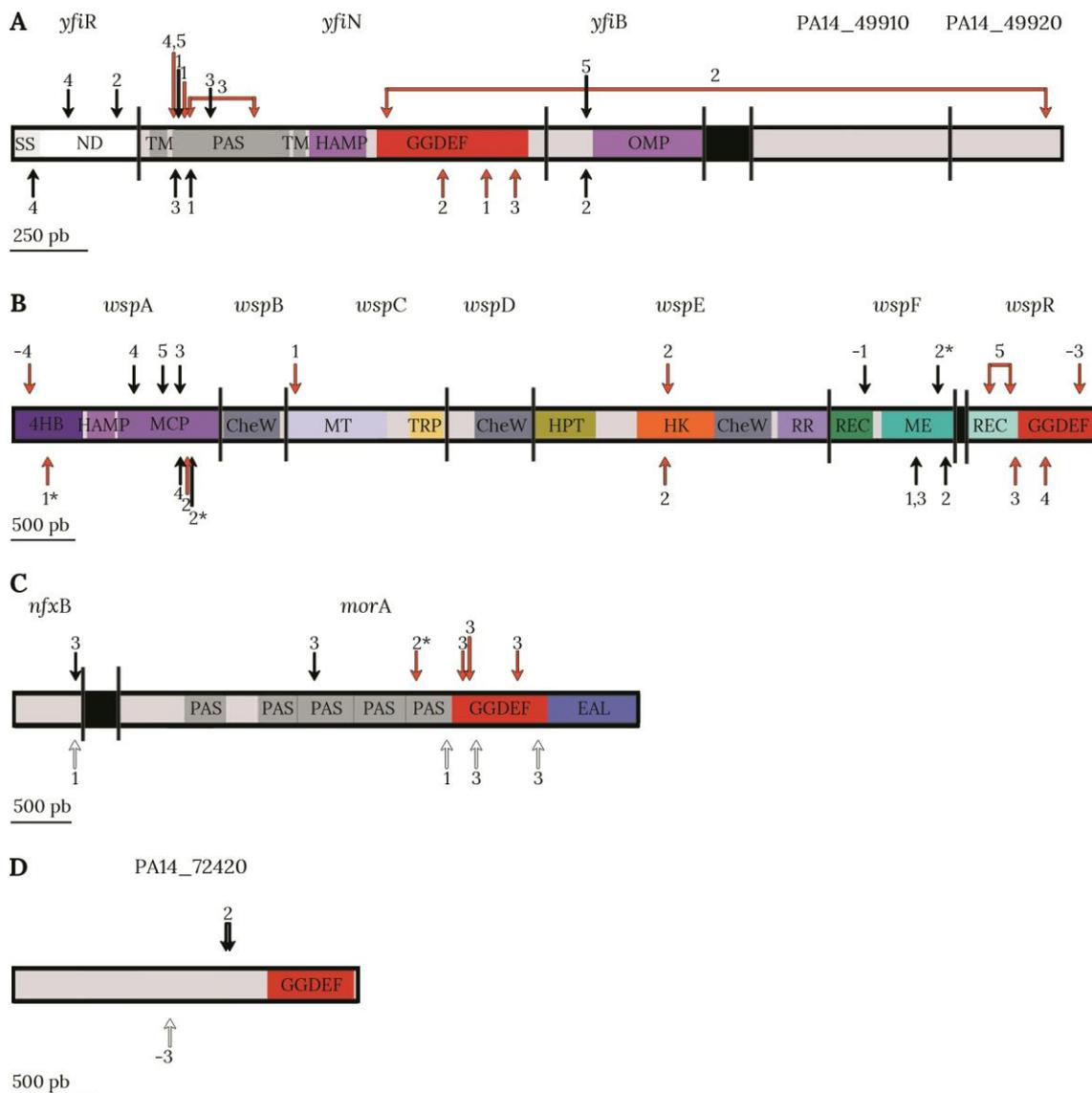


Figura R21. Localización de las mutaciones ocurridas durante el experimento de evolución *in vitro* en el sistema de transducción *wsp* (A), el sistema *yfi* (B), en los genes *nfxB*, *morA* (C) y PA14_72420 (D). Con flechas se indica las posiciones correspondientes a las secuencias de ADN donde se determinó la presencia de mutaciones en las líneas normomutadoras (por arriba del gen) e hipermutadoras (por debajo del gen). Las flechas negras y rojas indican que la mutación fue adquirida durante un ciclo de conversión o reversión, respectivamente, mientras que las flechas blancas indican que su participación no ha sido identificada hasta el momento. Los números asociados a cada flecha indican la línea evolutiva que alberga cada mutación, (*) señala que la mutación produce un codón de terminación, (-) indica la delección de 1 pb. Las delecciones mayores a 1 pb se indican con dos flechas unidas por una línea transversal. Los colores y las siglas indican los dominios que han sido predichos para cada una de las proteínas según InterPro (www.ebi.ac.uk/interpro/). SS: péptido señal, ND: dominio de función no determinada, TM: dominio transmembrana, PAS: dominio sensor de señales de activación, HAMP: dominio presente en histidín quinazas, adenilato ciclasas, proteínasceptoras de metilos y fosfatasa, GGDEF: dominio diguanilato ciclasa, OMP: dominio presente en proteínas de membrana externa, 4HB: dominio conformado por un manojito de 4 hélices, MCP: dominio aceptor de grupos metilo, CheW: dominio relacionado a quimiotaxis, MT: dominio metiltransferasa, TRP: dominio con repeticiones de tetratricopeptido, REC: dominio receptor de respuesta, ME: dominio metilesterasa. HTP: dominio de fosfotransferencia de histidín quinazas, HK: dominio histidina quinasa, RR: dominio regulador de la respuesta, REC: dominio receptor, ME: dominio metil esterasa, EAL: dominio fosfodiesterasa.

3.2.2. Línea evolutiva WT2.

La línea WT2 fue capaz de adaptarse a la conversión y reversión al fenotipo SCV durante 6 ciclos sucesivos (Figura R15). El clon SCV WT2R1 adquirió una sustitución A341G en el gen *yfiR*, generando que la Tirosina en la posición 114 de la secuencia proteica cambie por una Cisteína (Y114C). YfiR es un homodímero, en el que cada monómero forma una estructura globular formada por 7 láminas beta flanqueadas por alfa hélices en el N-ter y C-ter [204]. La sustitución se localiza en la quinta lámina, en donde precisamente se ha determinado que el residuo Y114 se encuentra altamente conservado [204,205]. Este indicio junto con la predicción realizada por el algoritmo SIFT, sugieren que la unión entre YfiR y la DGC YfiN estaría afectada, resultando en la desrepresión de YfiN y el consecuente incremento en la síntesis de c-di-GMP. Esta mutación fue compensada por una deleción de 1886 pb que abarca desde la posición 1165 del gen *yfiN*, la totalidad de los genes *yfiB* y PA14_49910, hasta la posición 330 del gen PA14_49920. Los genes PA14_49910 y PA14_49920 se localizan corriente abajo del sistema de transducción *yfi* y codifican para proteínas hipotéticas sin una función hasta el momento conocida. Es claro que como consecuencia de esta mutación, la función del sistema *yfi*BNR quedaría abolida y con ella la activación de YfiN producida en el ciclo anterior, disminuyendo los niveles de c-di-GMP a valores suficientes para revertir a un morfotipo similar al ancestral. En el clon SCV WT2R3 se observó la ocurrencia de una sustitución C895T en el gen *wspF*. Esta mutación genera que el codón CAG que codificaba para la Cisteína en la posición 299, cambie por el codón de terminación TAG (mutación sin sentido). El resultado es una proteína WspF trunca que no llega a expresar el dominio metilesterasa (Figura R21-B). Como se mencionó anteriormente, la pérdida de función del gen *wspF* genera que el sistema de transducción esté constitutivamente activo, incrementando los niveles de c-di-GMP intracelulares que conllevan a la obtención del fenotipo SCV [126,199]. Los niveles elevados de c-di-GMP fueron revertidos en el clon WT2R4 a través de una sustitución T1074G en el gen *wspE*, produciendo el cambio del Ácido Aspártico por un Ácido glutámico dentro del dominio histidín quinasa. Esta mutación no ha sido descrita hasta el momento en la bibliografía, pero dado el fenotipo que se observa en este clon revertido y la predicción realizada por el algoritmo SIFT, es posible

especular que tanto la activación de WspE y, como consecuencia, la fosforilación del regulador de respuesta WspR se encontrarían afectadas en esta variante. Debido a esta alteración, WspR no se activaría y los niveles de c-di-GMP intracelulares disminuirían, independientemente de que WspA se encuentre hipermetilado a consecuencia de la mutación en *wspF* adquirida en el ciclo anterior. Posteriormente, el clon SCV WT2R5 mostró una delección de 5 aminoácidos (Δ 1297-1312 pb) en la secuencia de PA14_72420 (Figura R21-D). Este gen posee un dominio GGDEF y codificaría para una DGC de localización citoplasmática [206]. Se ha descrito muy recientemente que en el gen ortólogo de *P. fluorescens*, la región donde se localiza la mutación aquí descrita funcionaría como un dominio que regula negativamente la actividad DGC, por lo que su disrupción incrementaría la actividad enzimática de la proteína con el concomitante incremento en la síntesis del c-di-GMP [207]. Es importante aclarar, que para el caso del clon WT2R5 la delección no genera un corrimiento en el marco de lectura, por lo que el dominio DGC se mantiene intacto y puede seguir siendo funcional. Finalmente, la última mutación adquirida en la línea WT2 fue una sustitución G2551T en el gen *morA*. Esta sustitución genera que el codón GAG que codificaba para el Ácido Glutámico en la posición 851 de la proteína, cambie por el codón stop TAG, dando como resultado una proteína trunca (E851*). MorA es una proteína definida como el regulador global de la motilidad [208]. Se encuentra anclada a membrana citoplasmática y posee tres dominios funcionales: uno transmembrana hacia el N-ter, una región central que consiste en la presencia de varios dominios PAS de señalización y una región catalítica hacia C-ter que incluye los dominios GGDEF y EAL, constituyendo así una proteína híbrida o de actividad dual (Figura R21-C) [208]. Se ha demostrado en la cepa de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14, que a consecuencia de la delección de este gen, la producción de biofilms es similar o menor a la cepa WT, mostrando menor adherencia al rojo Congo y una disminución en los movimientos mediados por flagelos, *swarming* y *swimming* [206]. La mutación E851*, no caracterizada hasta el momento, genera una proteína de menor tamaño que de ser funcional, ha perdido los dominios relacionados a la síntesis y degradación de c-di-GMP. Esta alteración de MorA funcional podría así asociarse con la adquisición de la morfología de colonias revertida por su función

como proteína híbrida involucrada en el metabolismo del segundo mensajero, y al mismo tiempo por ser regulador global de la motilidad, podría ser responsable de la alteración del *swarming* observado para el clon WT2R6 (Figura R12).

3.2.3. Línea evolutiva WT3.

El análisis llevado a cabo en la línea evolutiva WT3 evidenció la acumulación de 9 mutaciones (Tabla R3, Figura R15). La primera mutación en el clon SCV WT3R1 fue una sustitución G1357A que produce el cambio del aminoácido Valina por una Isoleucina en la posición 453 (V453I) del receptor WspA, particularmente en el dominio aceptor de grupos metilo (Figura R21-B). Si bien esta mutación no ha sido descrita previamente, debido a que su efecto es tolerado según lo predicho por el algoritmo SIFT, es posible especular que WspA seguiría siendo funcional pero la sustitución V453I modificaría su estado de metilación, activando la cascada de señalización que termina con la activación de WspR e incrementando de esta forma los niveles de c-di-GMP. Esta mutación es compensada en el siguiente ciclo a través de la delección de una C en la posición 928 del gen *wspR*. A consecuencia de ello, se genera un corrimiento en el marco de lectura del gen y la generación de un codón de terminación en la posición 336 de la proteína. Como resultado, se sintetizaría una proteína trunca que pierde los últimos 12 aminoácidos que incluyen parte del dominio GGDEF (Figura R21-B), afectando la actividad de la enzima WspR y disminuyendo los niveles de c-di-GMP. En los ciclos 3 y 4 de evolución se detectó la presencia de mutaciones en la DGC YfiN. En el primero de ellos, una sustitución G231A genera el cambio de ácido Glutámico por una Lisina en la posición 87 (E87K) que incluye al dominio PAS de YfiN (Figura R21-A). Tal como se mencionó anteriormente, este dominio conservado interacciona con el represor YfiR, de tal forma que en ausencia del represor, el dominio PAS transduce la información de activación hacia el dominio GGDEF de la proteína activándola. Por lo tanto, esta mutación interferiría con la unión del represor YfiR y la DGC YfiN, permitiendo el cambio conformacional y la concomitante síntesis de c-di-GMP. En este sentido, la mutación E87K ha sido descrita como la responsable de la obtención de una proteína YfiN insensible a la represión por YfiR, mediante ensayos de co-inmuno precipitación en aislados

hiperadherentes de *P. aeruginosa* recuperados a partir de muestras de esputo obtenidas de pacientes con FQ [186]. Posteriormente, el clon WT3R4 adquirió una delección de 53 nucleótidos que incluyen desde la posición 156 hasta 209 en la secuencia de ADN de *yfiN*. Esta mutación genera un corrimiento en el marco de lectura de la proteína que afecta no sólo a la correcta expresión de la DGC, sino que también compromete la expresión de la proteína sensora YfiB, cuyo gen se encuentra corriente debajo de *yfiN* (Figura R21-A). Esta delección, claramente deja al sistema de transducción *yfiBNR* anulado, compensando así el efecto de la mutación adquirida en el ciclo anterior, es decir, disminuyendo los niveles de c-di-GMP intracelulares y conllevando a la morfología de colonias revertida correspondiente.

Extrañamente, en el siguiente ciclo de conversión, el análisis de la historia mutacional en el clon WT3R5, no evidenció la presencia de ninguna mutación adicional. Cabe destacar que el fenómeno de conversión observado en el ciclo 5, a diferencia del resto de las SCV aisladas, se produjo a través de la adquisición de una morfología de colonias pequeña pero de aspecto liso (Figura R12). A su vez, en este clon en particular, aunque mostró una clara disminución en el *swarming*, la producción de biofilms y el comportamiento autoagregativo fueron similares a la cepa ancestral WT y a las colonias revertidas correspondientes. Cabe recordar que analizando los ensayos de reversión mediante la sobreexpresión de la FDE codificada en el vector pJN2133, se observó que el tamaño pequeño y el aspecto liso se mantuvieron prácticamente inalterados en el clon WT3R5, de manera similar a lo observado mediante la transformación con el vector utilizado como control (Figuras R18 y R21). Para profundizar en las causas de este fenómeno, el clon WT3R5 fue transformado con el plásmido pJN*wspR*, para observar el efecto de la sobreexpresión de una DGC. Tal como se observa en la Figura R22, aunque no se observó un cambio en el tamaño de la colonia, la misma adquirió una morfología rugosa, sumado a una capacidad formadora de biofilms y un comportamiento autoagregativo incrementados, similar al resto de las SCV caracterizadas en este trabajo. Estos resultados indicarían que el tamaño pequeño y la significativa disminución del *swarming* en el clon WT3R5 no estarían relacionados a la modulación de los niveles del c-di-GMP, constituyendo así un morfotipo diferente

que emerge a partir de cultivos en biofilms. La ausencia aparente de una mutación en el ciclo de conversión 5 puede explicarse o bien por un mecanismo diferente al mutagénico, como por ejemplo cambios epigenéticos, o bien por alguna falla en los análisis bioinformáticos que hubiera impedido la detección de la mutación.

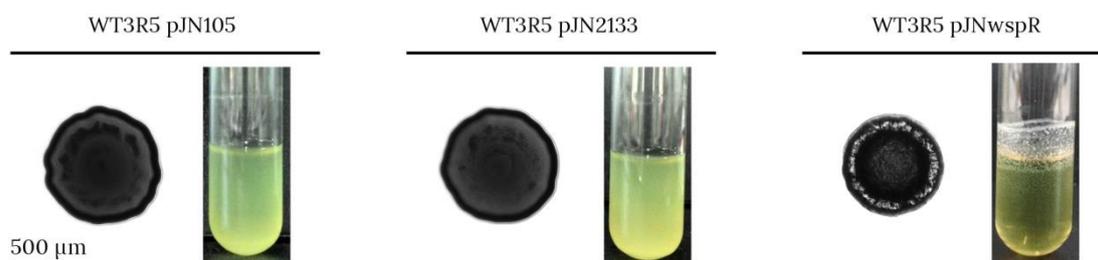


Figura R22. Efectos fenotípicos de la sobreexpresión de los genes PA2133 y *wspR* en el clon de *P. aeruginosa* WT3R5. Se detalla la morfología de colonias observada en placas de agar y el crecimiento en cultivos líquidos del clon WT3R5 transformado con el vector pJN105 (plásmido vacío), pJN2133 (FDE) y pJNwspR (DGC).

Notablemente, y a pesar de la ausencia de mutaciones en el ciclo 5, a partir del ciclo 6 fue posible observar la acumulación de una serie de mutaciones en el gen *morA* (ciclos 6, 8, 9 y 10), mientras en el ciclo 7 de conversión, se determinó la presencia de una mutación en el gen *nfxB* (Figura R15). Con respecto a las mutaciones determinadas en la secuencia del gen *morA*, todas ellas fueron SNPs con cambio de sentido: una sustitución T3423C localizada entre los dominios GGDEF y EAL en el ciclo 6 de evolución, una sustitución C2994A dentro del dominio GGDEF en el ciclo 8, una sustitución A1687C entre el segundo y tercer dominio PAS en el ciclo 9 y una sustitución C2982T ubicada dentro del dominio GGDEF en ciclo 10 de evolución (Figura R21-D). Si bien, estas mutaciones no han sido descritas hasta el momento, de acuerdo a la predicción hecha por SIFT (Tabla R3), todas ellas alterarían la función de la proteína MorA. Lo interesante de estas observaciones es que la compensación sufrida entre uno y otro ciclo de conversión y reversión, basada en el aumento y disminución del c-di-GMP intracelular, se produciría por mutaciones compensatorias intragénicas. El hecho de ser una proteína híbrida o de actividad dual, es quizá lo que le confiere a *P. aeruginosa* esta capacidad de modular su fenotipo y adaptarse en forma alternativa a dos condiciones ambientales preestablecidas a través de mutaciones en un

mismo gen. Es importante destacar asimismo, que a partir de la primera mutación adquirida en este gen durante el ciclo 6 de evolución, todas las variantes revertidas en adelante mostraron una reducción del *swarming*, la cual se evidenció como una reducción en el número y la extensión de las prolongaciones observadas en placas de agar semisólido (Figura R12). Esta observación está en directa relación con la función que posee MorA como proteína reguladora global de la motilidad [206,208].

La mutación que dio origen al clon con fenotipo SCV correspondiente al ciclo 7 afecta al gen *nfxB*, el cual codifica para un represor de la síntesis de la bomba *mexCD-oprJ* involucrada en el eflujo de antibióticos de la familia de las fluoroquinolonas [209,210]. Por lo tanto, en aislados clínicos de *P. aeruginosa*, mutaciones en el gen *nfxB* han sido caracterizadas como responsables de la adquisición de resistencia al antibiótico ciprofloxacina [211,212]. La pregunta que surge a partir de esta observación es: ¿por qué una mutación en *nfxB* estaría incrementando los niveles de c-di-GMP?. De manera interesante, los genes *morA* y *nfxB* se encuentran adyacentes uno al otro en el genoma de *P. aeruginosa*, separados por una pequeña región intergénica de 242 pb, estando *nfxB* localizado a 5' del gen *morA* (Figura R21-D). La mutación adquirida en el ciclo 7 sustituye el codón de terminación de *nfxB* por una cisteína, restituyendo el marco de lectura hasta un nuevo y potencial codón de terminación 204 pb corriente abajo. Esto genera una proteína NfxB de mayor tamaño y reduce la región intergénica entre ambos genes, a tan sólo 38 pb. De esta manera, es posible sugerir que las alteraciones en la región promotora del gen *morA*, podrían de algún modo afectar sus niveles de expresión produciendo un incremento de su actividad DGC o disminución de la FDE. Es clave en este punto mencionar que esta misma mutación ha sido previamente descrita como la responsable del incremento de la expresión de la bomba *mexCD-oprJ* y el incremento de la resistencia a ciprofloxacina en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 [209,213]. Sin embargo, no ha sido al momento relacionada con la conversión al fenotipo SCV. En este sentido y para profundizar en el análisis del efecto de la mutación *nfxB*, a continuación se midió la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM, ver Materiales y Métodos) a ciprofloxacina en todas las variantes que conforman la línea WT3. Tal como se observa en la

Figura R15, se determinó que la CIM a este antimicrobiano fue de 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los clones WT3R1 al WT3R6, valor que no fue significativamente diferente para el obtenido en la cepa de *P. aeruginosa* normomutadora ancestral. Sin embargo, a partir del ciclo 7 y coincidente con la adquisición de la mutación en *nfxB*, todos los clones mostraron una CIM incrementada de 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 7.5 veces mayor (Figura R15). Cuando se realizó la determinación de la CIM en el clon WT3R7 transformado con el vector pJN2133, el cual cabe recordar que expresa la FDE PA2133, se observó que mientras que el valor de la CIM a ciprofloxacina no se vio modificado, la morfología de colonias, la producción de biofilm, la autoagregación y la sobreproducción de exopolisacáridos claramente revertieron, obteniéndose propiedades fenotípicas similares a la cepa ancestral (Figura R18-C). Estos datos indican que la mutación A564C en el gen *nfxB* tendría 2 efectos simultáneos: por un lado incrementaría los niveles de c-di-GMP, al mismo tiempo que conferiría resistencia a ciprofloxacina. Esta observación constituye un mecanismo muy interesante en el cual, mediante la adquisición de una única mutación en el regulador negativo NfxB, la bacteria adquiere dos características que favorecen la adaptación a las vías aéreas de pacientes FQ: la conversión al fenotipo SCV, el consecuente incremento en su capacidad de formar biofilms, y la resistencia a antibióticos [78]. Otra conclusión interesante que surge de esta observación, es que dado el esquema evolutivo experimental aquí realizado, el cual no incluye la exposición a antibióticos, la resistencia a ciprofloxacina surge de manera espontánea y por un fenómeno de co-selección, que posteriormente se mantiene en los ciclos sucesivos, a pesar de que la bacteria continúa con el proceso de conversión/reversión SCV por mutaciones compensatorias que regulan los niveles de c-di-GMP.

Es importante frente a estos resultados destacar que *P. aeruginosa* es la principal especie patógena dentro de la familia *Pseudomonadaceae*. En este sentido, ¿cómo es la sintenia existente entre los reguladores *morA* y *nfxB* en otras cepas de *P. aeruginosa*, e incluso en otras especies del género *Pseudomonas*? Mediante un análisis bioinformático utilizando el servidor SynTax [214], se determinó la presencia de proteínas ortólogas a MorA y su contexto genético en un total de 235 secuencias genómicas pertenecientes a 54 especies del género *Pseudomonas*.

Interesantemente, se determinó que entre ellas y de manera exclusiva, las 95 secuencias genómicas pertenecientes a la especie *P. aeruginosa* poseen conservados el orden y la organización entre los genes *nfxB* y *morA*, mientras que en el resto de especies analizadas, si bien poseen genes ortólogos para ambos genes, estos se encuentran en posiciones distales en el genoma (Figura R23). De esta manera, las consecuencias adaptativas de esta mutación, y de mutaciones equivalentes en el gen *nfxB*, adquieren particular relevancia en términos de patogénesis en *P. aeruginosa* dada una organización genómica específica.

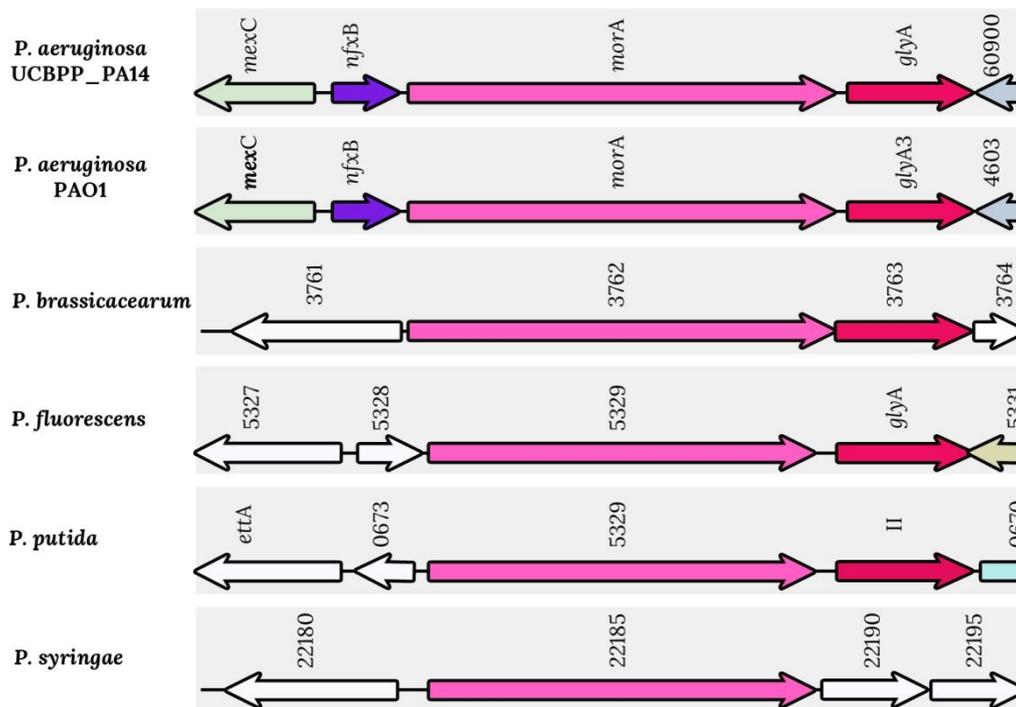


Figura R23. Sintenia observada para los genes *morA* y *nfxB* en especies representativas dentro del género *Pseudomonas*. A través del servidor bioinformático Syntax [214] se determinó el contexto genómico en el cual se encuentran los genes ortólogos a *morA* en un total de 235 secuencias genómicas pertenecientes a 54 especies de *Pseudomonas sp* analizadas en paralelo. La presencia del gen *nfxB* corriente arriba de *morA* fue únicamente detectada para los genomas analizados de la especie *P. aeruginosa*. Se detallan los resultados observados para especies representativas dentro del género *Pseudomonas*. Los genes que codifican para proteínas homólogas se muestran del mismo color.

3.2.4. Línea evolutiva WT4.

La línea evolutiva WT4 demostró la presencia de 4 mutaciones en los sistemas *yfi* y *wsp*, las cuales afectan la función de las correspondientes proteínas según la predicción realizada por SIFT (Tabla R3). La primera de ellas fue una

sustitución T118C en el gen *yfiR*, la cual genera el cambio del aminoácido Triptófano por una Arginina en la posición 61 de la proteína (W61R). Si bien, esta sustitución no ha sido caracterizada previamente, se ha demostrado que el W61 se encuentra altamente conservado incluso cuando se analizan secuencias derivadas de bacterias distales a *P. aeruginosa* [186]. Esta observación indica que probablemente la sustitución afectaría el rol de YfiR como represor del sistema de transducción, permitiendo el cambio conformacional y activación de YfiN, un aumento en la síntesis del c-di-GMP y la consecuente conversión SCV. Posteriormente, esta mutación fue compensada en el clon WT4R2 por una sustitución A112C en la secuencia del gen *yfiN*, que genera el cambio de la Treonina por una Prolina en la posición 38 de la secuencia de proteínas (T38P), comprendido en el dominio PAS de YfiN (Figura R21-A). Esta mutación tampoco ha sido descrita previamente, pero sus efectos en relación a la morfología de colonias y sus fenotipos asociados sugerirían que inhabilita la función de la DGC disminuyendo los niveles de c-di-GMP. En los ciclos 3 y 4 se adquirieron mutaciones en la proteína receptora WspA. En el ciclo 3, se observó la sustitución C1001T que genera el cambio del aminoácido Alanina por una Valina en la posición 334 de la secuencia de proteína (A334V). Particularmente, esta sustitución se localiza dentro del dominio aceptor de grupos metilo de *wspA* (Figura R21-B), sugiriendo que podría estar produciendo un estado de activación del sistema *wsp*, que conllevaría a la activación de la proteína WspR y a la síntesis del c-di-GMP. Posteriormente, esta mutación es compensada por una nueva mutación en el mismo gen: la delección de una G en la posición 136 (Δ G136), la cual produce un corrimiento en el marco de lectura y la consecuente expresión de un codón de terminación en la posición 78 de la proteína. Así, esta proteína trunca posee 464 aminoácidos menos en relación a la proteína salvaje, lo cual bloquea la función de WspA y compensaría el efecto producido por la mutación adquirida en el ciclo anterior, es decir, disminuiría los niveles de c-di-GMP.

3.2.5. Línea evolutiva WT5.

Por último, el análisis realizado en la línea evolutiva WT5 mostró igualmente la presencia de 4 mutaciones en los sistemas *wsp* e *yfi* (Tabla R3). La

primera de ellas fue una sustitución C1232T en la secuencia de *wspA*. Esta mutación produce el cambio del aminoácido Alanina por una Valina en la posición 411 de la secuencia de proteínas (V411A). Particularmente, el aminoácido A411 localizado en el dominio aceptor de grupos metilo (Figura R21-B), se encuentra altamente conservado [202], por lo tanto, la sustitución podría estar afectando la señalización del sistema *wsp* y activando a la DGC WspR. Posteriormente, este efecto fue compensado mediante una delección de 6 nucleótidos en el gen *wspR* (Δ 162-168), que genera la sustracción de 2 aminoácidos en el dominio receptor de la señal de esta proteína (Figura R21-B). De esta manera, es posible suponer que la actividad de la DGC se encuentra afectada, disminuyendo los niveles intracelulares del c-di-GMP. En el ciclo de conversión subsiguiente, el clon WT5R3 adquirió una mutación en la proteína sensora YfiB. La sustitución T128A genera el cambio del aminoácido Leucina por una Histidina en la posición 43 de la proteína (L43H). Esta mutación ha sido descrita previamente como la responsable de la formación de un complejo estable con el represor YfiR, que permite el cambio conformacional de YfiN y conlleva a la conversión al fenotipo SCV [186,215]. Finalmente, esta mutación fue compensada por la misma sustitución A112C en *yfiN* observada en el clon WT4R2 de la línea evolutiva WT4. Ambas subyacen eventos de reversión dando cuenta de una directa alteración de la DGC YfiN y consecuente disminución de los niveles de c-di-GMP. Es interesante destacar cómo una misma mutación funcionó como compensatoria de mutaciones diferentes y producidas en factores diferentes (*yfiR* e *yfiB*), siempre que concurrentemente en términos funcionales, afectaron el mismo sistema y la actividad de la misma DGC YfiN.

3.2.6. Indicios de evolución paralela en las líneas evolutivas de *P. aeruginosa* normomutadoras.

Los resultados hasta aquí obtenidos del experimento de evolución realizado a partir de un ancestro común normomutador en 5 líneas independientes, claramente revelan que la estrategia implementada por la bacteria *P. aeruginosa* para su adaptación a ciclos de conversión y reversión SCV sucesivos está mediada por la adquisición de mutaciones compensatorias en genes que participan en la regulación de la concentración intracelular de c-di-GMP.

Particularmente, el genoma de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 posee un total de 40 genes con dominios GGDEF, EAL o HD-GYP [176,206,216], que funcionarían como DGC y FDE, dando cuenta a primera vista de una alta redundancia a simple vista a nivel funcional o un reservorio genético importante para regular este segundo mensajero. Sin embargo, en el modelo de evolución *in vitro*, la bacteria se adaptó a través de modificaciones por mutaciones en tan sólo 4 de estas proteínas: YfiN, WspR, MorA y PA14_72420. Es más, las mutaciones en estos genes, o en los sistemas de transducción que los regulan, parecen seguir un orden secuencial, en donde primero y en todos los casos, se afectan los sistemas *wsp* e *yfi* en forma indistinta. Las líneas WT2 y WT3 que superan la restricción genética producida en el ciclo 5, se adaptan afectando otras enzimas como la dual MorA y la DGC PA14_72420. De esta manera, el grado de paralelismo evolutivo en las líneas evolutivas fue remarcable y resulta poco probable que estas mutaciones hayan emergido únicamente por azar. Para aproximarse a la confirmación de esta hipótesis, se procedió a comparar estadísticamente el número observado (N_o) de mutaciones en genes con dominios DGC o FDE, respecto del número esperado (N_e) si sólo el azar estuviera dominando el fenómeno. Para calcular N_e se utilizó la siguiente fórmula modificada de Traverse y colaboradores [217]:

$$N_e = N \times P$$

$$\text{donde } P = \frac{\text{n}^\circ \text{ de genes DGC o FDE en el genoma}}{\text{total de genes en el genoma}}$$

En esta fórmula, N_e representa el número esperado de mutaciones por azar; P representa la fracción del genoma que corresponde a enzimas con dominios DGC/FDE y es la probabilidad de que una mutación afecte por azar estas funciones; y N es el total de mutaciones encontradas durante el experimento. Considerando que el genoma de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 posee un total de 5892 genes codificantes [52], la probabilidad P de que una mutación por azar genere cambios en alguno de los 40 genes con dominios DGC y/o FDE es $P=0.0068$. Asimismo, los resultados obtenidos describen la ocurrencia de un total de 27

mutaciones (N) considerando las acumuladas en las 5 líneas evolutivas normomutadoras (Tabla R3). Por lo tanto, el número de mutaciones esperado (N_e) en genes relacionados a la síntesis o degradación del c-di-GMP es $N_e=27 \times 0.0068 \sim 0.2$. Por su lado, el número de mutaciones observadas (N_o) para genes codificantes de enzimas con estos dominios, que en este caso sólo incluyen a los genes *yfiN*, *wspR*, *morA* y PA14_72420, fue igual a 15 (Tabla R3). De esta manera, el número observado supera ampliamente el número de mutaciones esperado por azar. Estos datos fueron evaluados a través de la prueba estadística Chi-cuadrado, obteniéndose los valores $\chi^2_1 = 1303$ y $P < 0.001$, los cuales indican que la ocurrencia de mutaciones ocurridas en genes con dominios DGC y FDE no tienen un fundamento azaroso, por lo que están siendo seleccionadas positivamente en este sistema. A su vez, y sumando el fuerte paralelismo evolutivo entre las líneas, es posible sugerir que, a pesar de la aparente redundancia funcional que existiría en relación a la regulación de los niveles de c-di-GMP, la probabilidad de acceder a la conversión/reversión al fenotipo SCV por una vía genética u otra no es la misma y que para este caso en particular, la mutación de los sistemas *wsp* e *yfi* es significativamente más alta.

En el diseño experimental descrito y llevado a cabo en este trabajo, un único clon fue seleccionado al azar en cada ciclo evolutivo y fue posteriormente utilizado como fundador de un nuevo ciclo de conversión o reversión consecutivo. Así, este diseño experimental no brinda información a nivel de la población de variantes SCV en el biofilm formado en cada ciclo. Con el objeto de analizar el fenómeno de conversión SCV a nivel poblacional, a partir del biofilm cosechado en el ciclo 1 de conversión de la línea normomutadora WT1, se aislaron al azar 10 colonias con características SCV y el fragmento que comprende la mutación T119C en *yfiN* previamente descrita para el clon WT1R1, fue amplificado por PCR y secuenciado para cada uno de ellos. Como resultado se observó que las 10 colonias SCV obtenidas del mismo cultivo en biofilm perteneciente al ciclo 1 poseían la mutación T119C en *yfiN*. Este resultado sugiere una emergencia temprana de esta mutación durante el desarrollo del biofilm, y que siendo netamente adaptativa, permitiría por eventos de selección, enriquecer y dominar la población.

3.3. Análisis de las líneas evolutivas de *P. aeruginosa* derivadas del ancestro hipermutador.

Con el fin de estudiar el proceso de conversión y reversión al fenotipo SCV en cepas deficientes en el MRS, se procedió a la obtención de las secuencias de los genomas completos del ancestro hipermutador y de distintos clones evolucionados obtenidos a partir de las 4 líneas evolutivas hipermutadoras paralelamente evolucionadas (Figura R14, ver Materiales y Métodos, Tabla M3).

El análisis de las secuencias genómicas mostró que en relación a sus pares normomutadores, el número de mutaciones acumuladas fue significativamente mayor, alcanzando un promedio de 19 ± 2 mutaciones por ciclo de evolución (Tabla R4). El espectro de mutación observado fue, según lo esperado, coincidente con lo anteriormente documentado para cepas de *P. aeruginosa* hipermutadoras por deficiencia en el MRS [17,145]. Así, y tal como se muestra en la Figura R24, este espectro estuvo dominado por transiciones seguidas de inserciones/deleciones (indels) de 1-4 pb de longitud, las cuales en su mayoría estuvieron localizadas en secuencias repetidas simples (SSR) de G:C.

Tabla R4. Mutaciones acumuladas y frecuencia de mutación observada en los distintos clones de *P. aeruginosa* hipermutadores secuenciados.

Línea evolutiva	Clon	Nº total de mutaciones	Frecuencia de mutación ¹
1	<i>mutS1R3</i>	52	17
	<i>mutS1R9</i>	163	18
	<i>mutS1R13</i>	234	18
	<i>mutS1R15</i>	349	23
2	<i>mutS2R3</i>	60	20
	<i>mutS2R5</i>	97	19
	<i>mutS2R11</i>	221	20
	<i>mutS2R15</i>	264	18
3	<i>mutS3R3</i>	68	22
	<i>mutS3R15</i>	278	19
4	<i>mutS4R3</i>	60	20

¹Número de mutaciones promedio acumuladas por ciclo de evolución

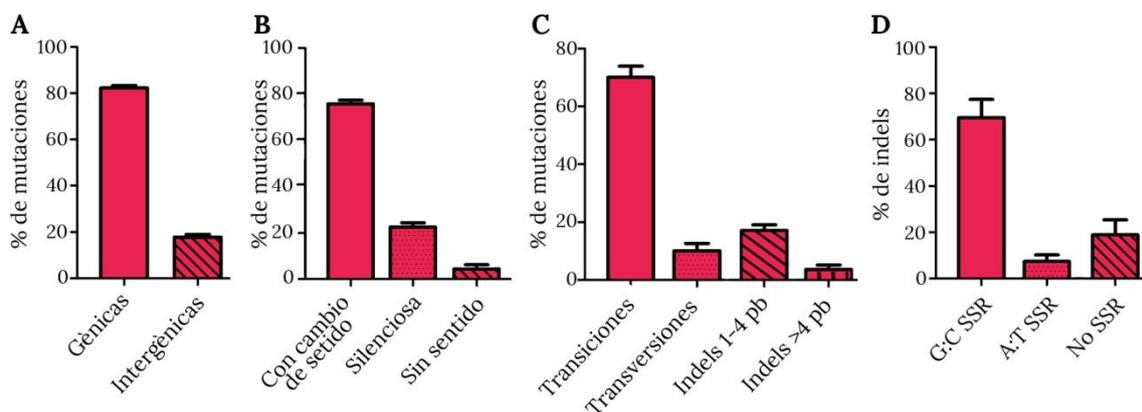


Figura R24. Espectro de mutación determinado en los clones de *P. aeruginosa* hipermutadores evolucionados. (A) Clasificación del total de mutaciones acumuladas en función a su localización en regiones codificantes (mutaciones génicas) y no codificantes (intergénicas). (B) Clasificación de las mutaciones acumuladas en las regiones codificantes de acuerdo a su efecto en la traducción a proteínas. (C) Clasificación respecto al tipo de mutación, considerando el porcentaje de transiciones, transversiones e inserciones/delecciones (indels). (D) Localización de indels en secuencias repetidas simples (SSRs) homopoliméricas G:C y A:T o en secuencias que no corresponden a SSRs (no SSRs). Para cada caso se expresa el promedio y el error estándar obtenidos en cada categoría para todos los genomas hipermutadores secuenciados y analizados.

Frente al elevado número de mutaciones acumuladas y con el objetivo de analizar su impacto global, se realizó una clasificación funcional de acuerdo a las categorías establecidas en la base de datos “The *Pseudomonas* Community Annotation Project” (www.Pseudomonas.com). Para este análisis se incluyó únicamente aquellas mutaciones que generen un cambio en la secuencia de proteínas (mutaciones no sinónimas). Como se puede observar en la Figura R25, dentro de las categorías que contienen mayor número de genes mutados se incluyen: genes relacionados al transporte de pequeñas moléculas y enzimas putativas, seguidas por categorías relacionadas a distintos aspectos del metabolismo, reguladores transcripcionales, genes relacionados con traducción y modificación de proteínas así como sistemas de dos componentes. Sin embargo, a pesar de ser un número menor, se observó que parte de los genes afectados estaban relacionados a la motilidad y adherencia de las bacterias, donde se incluye al sistema *yfi*, así como a quimiotaxis, donde el sistema *wsp* está incluido, en base a



Figura R25. Clasificación funcional de las mutaciones encontradas en las secuencias genómicas pertenecientes a las líneas evolutivas hipermutadoras. La clasificación funcional fue realizada de acuerdo a las categorías descritas en “The Pseudomonas Community Annotation Project” (www.Pseudomonas.com). El gráfico indica el número de mutaciones de acuerdo a cada categoría. Se consideraron únicamente las mutaciones no sinónimas. La categoría funcional “Hipotético, sin clasificar, desconocido”, que representó en promedio un 22% de las mutaciones, no fue incluida en el análisis.

los cuales podría explicarse el fenómeno de conversión y reversión a nivel fenotípico. Tal como se detalla en la Tabla R6, se observaron un total de 49 mutaciones en las 4 líneas evolutivas que estuvieron localizadas en genes relacionados a las funciones mencionadas. De acuerdo al análisis del efecto de estas mutaciones realizado mediante los programas predictor SNPeff y SIFT, se observó que estas mutaciones tendrían un efecto moderado a alto en la funcionalidad de la proteína codificante (Tabla R6). En base a estos resultados, se planteó la posibilidad que entre las mutaciones acumuladas, sólo algunas de ellas estarían relacionadas a la adaptación y subyaciendo los eventos de conversión y reversión SCV, mientras que el resto tendrían un efecto neutro o bien participarían de un ajuste fenotípico fino (“fine tuning”) del proceso adaptativo. Con el fin de

aproximarse a la confirmación de esta hipótesis, seguidamente se focalizó el estudio en el análisis de los genes comprendidos en los sistemas *wsp* e *yfi* y de las mutaciones en ellos acumuladas. Para ello, mediante amplificación por PCR de los fragmentos de ADN que contenían cada mutación y posterior secuenciamiento directo, se indagó en la historia mutacional, es decir, el estudio del orden en que estas mutaciones fueron adquiridas en cada una de las líneas evolutivas. Sorprendentemente, en un patrón similar a lo observado en líneas normomutadoras, las mutaciones en estos sistemas de transducción de señales se acumularon de a una por ciclo y particularmente en los primeros 4 ciclos de evolución (Figura R26). Una observación interesante la mostró la línea *mutS2* que en los ciclos 5 y 6 acumuló nuevas mutaciones en los genes *wsp* (mutados previamente en los ciclos 1 y 2) mostrando una mayor flexibilidad de este sistema para regular los niveles de c-di-GMP (Figura R26 y Tabla R6).

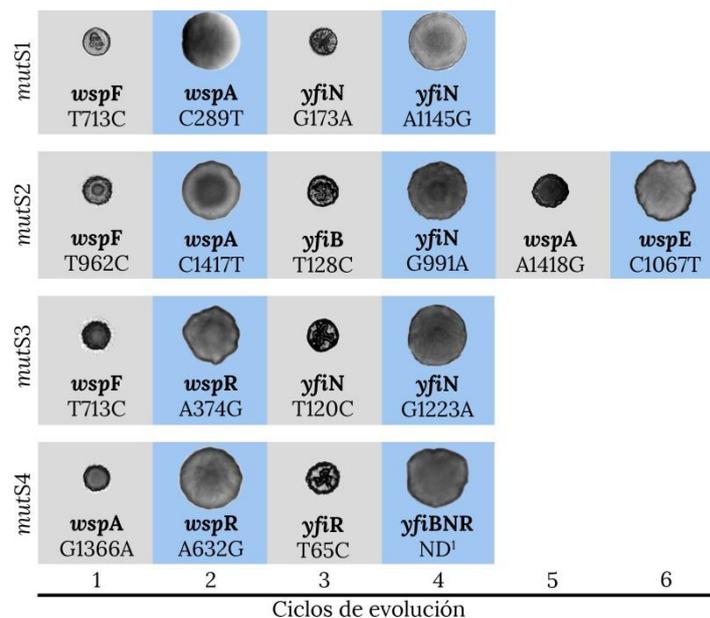


Figura R26. Mutaciones acumuladas en los sistemas *wsp* e *yfi* en las 4 líneas hipermutadoras Las mutaciones fueron analizadas a través de la amplificación por PCR y secuenciamiento directo de los fragmentos que las contenían en cada uno de los clones de las 4 líneas evolutivas. La morfología fue observada en placas de agar y fotografiada utilizando la cámara Axiocam acoplada a un microscopio directo Axioplan equipado con un objetivo 4X. Se describe el nombre del gen y la sustitución observada en la secuencia de ADN. A la izquierda se indica el nombre de la línea evolutiva normomutadora analizada. Los ciclos de conversión y reversión al fenotipo SCV se denotan con barras grises o celestes, respectivamente. Los números indican ciclos sucesivos de evolución. ¹ND indica que la presencia de la mutación no ha sido hasta el momento determinada, pero hay indicios que indican que estaría presente en el sistema de transducción *yfiBNR*.

Tabla R6. Mutaciones acumuladas durante el proceso de evolución en las líneas hipermutadoras relacionadas a la regulación del c-di-GMP, la motilidad y la adherencia de la bacteria.

Línea	Gen ¹	Mutación ²	Función/descripción ³	SNPeff ⁴	SIFT ⁵
mutS1	wspF	T713C (L238P)	Metilesterasa	Moderado	Afectada
	wspA	C289T (G97*)	Proteína aceptora metilos	Moderado	-
	yfiN	G173A (R58H)	DGC	Moderado	Tolerada
	yfiN	A1145G (H382R)	DGC	Moderado	Tolerada
	morA	T2840C (V947A)	DGC / FDE	Moderado	Afectada
	nfxB	T562C (*188C)	Regulador transcripcional	Moderado	-
	pvrS	+1 C 1697	Proteína sensora	Alto	-
	rbdA	A1666G (W556R)	DGC / FDE	Moderado	Tolerada
	pelB	A2872G (S958G)	Biosíntesis de exopolisacáridos	Moderado	Tolerada
	flgL	C886T (V296I)	Asociada al cuerpo flagelar	Moderado	-
	cupC2	+2 G 634	Chaperona asociada a pili	Alto	-
	orfH	C478T (R160*)	Biosíntesis de polisacáridos	Moderado	-
	orfN	+1 G 138	Glicosil transferasa	Alto	-
	PA14_69760	Δ C 668	Relacionada a fimbrias	Alto	-
	fliF	A1444G (F482L)	Proteína del anillo MS-flagelar	Moderado	Afectada
	pilU	T359C (L120P)	Proteína de twitching	Moderado	Tolerada
	orfJ	Δ G 549	Glicosil transferasa	Alto	-
pilD	+1 C 239	Prepilina peptidasa	Alto	-	
mutS2	wspF	T962C (L321P)	Metilesterasa	Moderado	Afectada
	wspA	C1417T (Q473*)	Proteína aceptora metilos	Moderado	-
	yfiB	T128C (L43P)	Lipoproteína	Moderado	Afectada
	yfiN	G991A (E331K)	DGC	Moderado	Afectada
	wspA	A1418G (*473W)	Proteína aceptora metilos	Moderado	Tolerada
	wspE	C1067T (A356V)	Proteína efectora	Moderado	Afectada
	PA14_12820	Δ 1128-33	Relacionada a una FDE	Alto	-
	PA14_14530	+1 G 1528	FDE	Alto	-
	pelB	A1847G (Y616C)	Relacionada a exopolisacáridos	Moderado	Afectada
	orfN	+1 G 138	Glicosil transferasa	Alto	-
mutS3	wspF	T713C (L238P)	Metilesterasa	Moderado	Afectada
	wspR	A374G (D125G)	DGC	Moderado	Afectada
	yfiN	T119C (V40A)	DGC	Moderado	Tolerada
	yfiN	G1223A (R408Q)	DGC	Moderado	Tolerada
	morA	G3082A (G1028S)	DGC / FDE	Moderado	Afectada
	morA	T3629C (V1210A)	DGC / FDE	Moderado	Afectada
	bifA	C1483T (Q495*)	DGC/FDE	Moderado	-
	PA14_72420	+1 T 954	DGC	Alto	-
	PA14_71840	G1984A (R662W)	Relacionada a una DGC / FDE	Moderado	Afectada
	lecB	G280C (G94R)	Lecitina PA-IIL	Moderado	Tolerada
	orfN	+1 G 138	Glicosiltransferasa de flagelina	Alto	-
	fliF	T184C (S62P)	Proteína del anillo MS-flagelar	Moderado	Tolerada
	fliF	C916T (P306S)	Proteína del anillo MS-flagelar	Moderado	Tolerada
	pilO2	G593A (G198S)	Proteína de pili tipo IV	Moderado	Tolerada
	pilQ2	Δ G 612	Proteína de pili tipo IV	Alto	-
	pilX	T80C (V27A)	Proteína de fimbrias	Moderado	Afectada
	csuD	G1888A (G630S)	Proteína de pili	Moderado	Afectada

Tabla R6. Continuación.

mutS4	wspA	G1366A (G456S)	Proteína aceptora metilos	Moderado	Tolerada
	wspR	A632G (D211G)	DGC	Moderado	Afectada
	yfiR	T65C (L22P)	Proteína represora	Moderado	Afectada

Los genes fueron seleccionados en base a la presencia de dominios diguanilato ciclasa (DGC) o fosfodiesterasa (FDE), o a su relación con la regulación de enzimas con estos dominios, o bien por estar relacionados a propiedades fenotípicas asociadas al morfotipo SCV, tales como motilidad y adherencia, producción de exopolisacáridos y biosíntesis de pili, fimbrias y flagelos. ¹En negrita se resaltan los genes que han sido relacionados de manera directa al metabolismo del c-di-GMP. ²Entre paréntesis se indica el cambio en la secuencia de aminoácidos. El asterisco indica la presencia de un codón de terminación. El símbolo Δ indica una mutación de tipo deleción, mientras el símbolo + indica una mutación por inserción. En negrita se resaltan mutaciones que han sido previamente descritas en clones de *P. aeruginosa* aislados a partir de muestras de esputo de pacientes con FQ [186]. ³La información relacionada a la probable función fue extraída de la base de datos Pseudomonas.com. ⁴Predicción bioinformática del efecto de la mutación sobre la expresión del gen utilizando el algoritmo SNPeff [184]. ⁵Predicción bioinformática del efecto de una mutación en la función de la proteína utilizando el algoritmo SIFT [185].

En conjunto, estos resultados sugieren que las mutaciones en los sistemas *wsp* e *yfi* serían las responsables de modular los niveles intracelulares del c-di-GMP para mantenerlos elevados durante los ciclos de conversión y disminuirlos posteriormente durante los ciclos de reversión. Como una aproximación a esta hipótesis, a continuación se procedió a realizar la reversión de los clones SCV mediante la sobreexpresión de la FDE codificada por el gen PA2133, de manera análoga a lo realizado para clones normomutadores. Para ello y debido a que la hipermutabilidad de la cepa ancestral se basa en la interrupción del gen *mutS* con un cassette de resistencia a gentamicina (Tabla M1), se construyeron los vectores pJN105Tc y pJN2133Tc, a través del clonado de un cassette de resistencia a Tetraciclina (Tc) en los plásmidos pJN105 y pJN2133, respectivamente. Con este par de vectores, se realizó la transformación de los clones SCV pertenecientes a las distintas líneas hipermutadoras y la posterior determinación del fenotipo observado. En la Figura R27 se detallan a modo de ejemplo, los resultados obtenidos con la línea *mutS1*. Es posible observar que la sobreexpresión de la FDE PA2133 revirtió las propiedades fenotípicas de todas las SCV analizadas y permitió la adquisición de una morfología y características similares a la cepa ancestral y a las variantes revertidas. Específicamente, la sobreexpresión de la FDE heteróloga aumentó el tamaño de la colonia, disminuyó la rugosidad y disminuyó la producción de biofilms. Estos parámetros se mantuvieron constantes en los clones transformados con el plásmido pJN105Tc vacío utilizado como control. De esta manera, se pudo confirmar que el mecanismo que permitiría la conversión al

fenotipo SCV en líneas hipermutadoras, involucraría igualmente cambios en los niveles de c-di-GMP, ya que la reversión de las variantes SCV mediante la sobreexpresión de una FDE da cuenta que su morfología de colonias, así como los fenotipos asociados, estarían basados en niveles del segundo mensajero elevados.

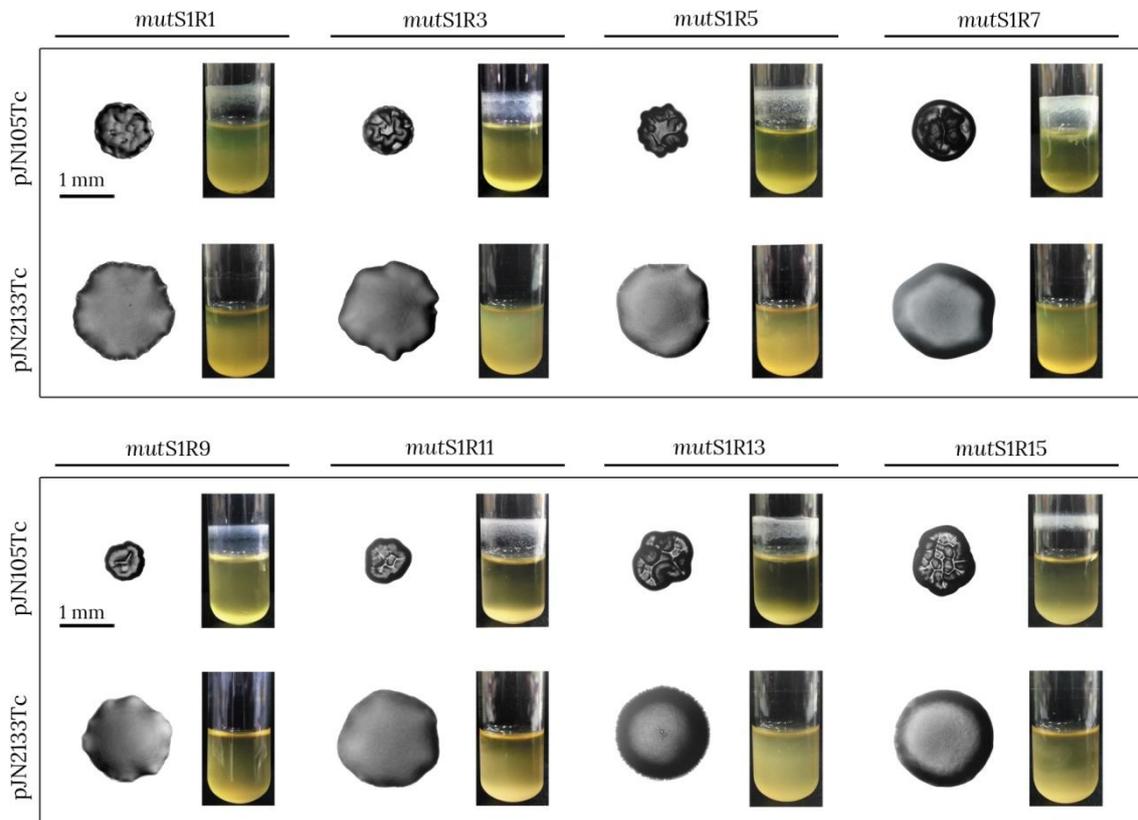


Figura R27. Ensayo de complementación del fenotipo SCV mediante la sobreexpresión de la FDE PA2133. En la Figura se muestran los ensayos llevados a cabo con los clones SCV correspondientes a la línea evolutiva hipermutadora *mutS1*. Se muestra la morfología de colonias así como la formación de biofilms y comportamiento autoagregativo en cultivos líquidos obtenidos a partir de los clones transformados con el plásmido pJN2133Tc o con el pJN105Tc utilizado como control. Este mismo ensayo fue llevado a cabo con los clones SCV correspondientes a las líneas *mutS2*, *mutS3* y *mutS4*, obteniéndose resultados equivalentes.

Seguidamente, se llevó a cabo un estudio bioinformático estructural utilizando bases de datos y bibliografía disponible para evaluar el posible efecto de cada mutación en la funcionalidad de los sistemas *wsp* e *yfi* (Figura R21). Estos análisis indicaron que, al igual que en el caso de las líneas normomutadoras, las mutaciones acumuladas de a una por ciclo durante el transcurso de los primeros 4 ciclos evolutivos, afectarían la función de los sistemas de modo compensatorio.

Una observación a destacar fue que el sistema *wsp* fue siempre mutado en primer lugar, siendo el dominio metiltransferasa de *wspF* una suerte de “punto caliente” en las hipermutadoras, ya que en 3 de las 4 líneas, las mutaciones se localizaron particularmente en este dominio. Cabe asimismo destacar que de las 17 mutaciones observadas en los sistemas *wsp* e *yfi*, V40A en *yfiN* y L43P en *yfiB* han sido previamente descritas en clones de *P. aeruginosa* aislados a partir de muestras de esputo de pacientes con FQ [186]. Las 15 restantes son descritas por primera vez en este trabajo, las cuales junto a las 17 mutaciones nuevas descritas en las cepas normomutadoras (Tabla R3), dan cuenta de la riqueza de mutaciones mediante las cuales *P. aeruginosa* puede adaptarse a este esquema evolutivo.

A manera de ejemplo del análisis realizado, a continuación se desarrollan los resultados observados para el caso de las líneas evolutivas *mutS1* y *mutS2* (Figura R26).

3.3.1. Línea evolutiva *mutS1*.

En el ciclo 1 de conversión se observó la presencia de una mutación T713C en el gen *wspF*. Esta transición genera el cambio del aminoácido Leucina por una Prolina en la posición 238 (L238P), la cual se localiza en el dominio metiltransferasa de WspF (Figura R21). Si bien esta mutación no ha sido descrita previamente en la literatura, es posible concluir que a consecuencia de la alteración en la funcionalidad de WspF, el receptor WspA se encontraría hipermetilado, incrementando los niveles de c-di-GMP por una activación constitutiva del sistema [126,199]. Posteriormente, el clon *mutS1R2* adquirió una mutación compensatoria en WspA a través de una transición C289T que genera el cambio del aminoácido Glutamina por un codón de terminación en la posición 97 de la proteína (G97*). De esta manera, el efecto de la mutación adquirida durante el ciclo anterior quedaría completamente abolido, dado que la proteína trunca que se obtiene no posee el dominio 4HB de anclaje a membrana ni el dominio aceptor de grupos metilo (Figura R21). En un evento posterior, el clon *mutS1R3* evidenció una mutación G173A en el gen *yfiN*. Esta sustitución genera un cambio del aminoácido Arginina por una Histidina en la posición 58 (R58H) que compromete al dominio PAS, el cual está involucrado en la interacción con la proteína YfiR. Esta sustitución

impediría la correcta interacción entre la proteína represora y la DGC YfiN, permitiendo el cambio conformacional que conllevaría a su activación enzimática, al incremento de los niveles de c-di-GMP intracelulares y a la adquisición de la morfología SCV. Esta suposición está avalada por evidencias previamente publicadas, las cuales indican que la sustitución de la Arginina por un residuo de Cisteína (R58C) genera una versión constitutivamente activa de la proteína YfiN y es responsable del incremento en la adherencia observada en clones de *P. aeruginosa* aislados a partir de muestras de esputo provenientes de pacientes con FQ [186]. La mutación R58H fue compensada en un ciclo subsiguiente a través de la adquisición de una nueva mutación en el mismo gen: una transición A1145G que genera un cambio de los aminoácidos H382R en YfiN. Esta sustitución está incluida en el dominio GGDEF de YfiN (Figura R21), por la que afectaría su actividad DGC, disminuyendo los niveles de c-di-GMP y obteniéndose como consecuencia una morfología de colonias revertida. Es importante remarcar que la transición T713C en *wspF* observada en el clon *mutS1R1*, fue determinada igualmente en el ciclo 1 de evolución de la línea *mutS3* (Tabla R69), lo cual indica un sesgo en hipermutadoras a determinados genes y secuencias, posiblemente basado en el espectro de mutación particular de estas cepas [145,147,148]. Sin embargo, mientras en el clon *mutS1R2* esta mutación es compensada a través del gen *wspA*, en el clon *mutS3R2* se realiza a través del gen *wspR*. En este último caso, la transición A374G genera el cambio D125G (Tabla R6) en el dominio receptor de respuesta (REC) y muy cerca de los residuos involucrados en la dimerización de WspR, lo que podría comprometer el estado oligomérico necesario para la actividad DGC. El hecho de que una misma mutación sea compensada por mutaciones en genes diferentes dentro del mismo sistema de transducción, da cuenta de la flexibilidad genética que poseen estos sistemas para lograr modular los niveles de c-di-GMP a través de mutaciones.

3.3.2. Línea evolutiva *mutS2*.

El análisis llevado a cabo con la línea hipermutadora *mutS2* evidenció la acumulación de 6 mutaciones en los sistemas de transducción *wsp* e *yfi* (Tabla R6). La primera de ellas fue la transición T962C que genera el cambio L238P en el

dominio metilesterasa de WspF (Figura R21). Como se mencionó anteriormente, se ha descrito previamente que mutaciones (por delección o por inserción de un transposón) en el gen *wspF* alteran el estado de metilación del receptor *wpsA*, el cual quedaría hipermetilado, produciendo la activación constitutiva del sistema *wsp* y la consecuente síntesis de c-di-GMP [126,199]. Esta mutación es compensada en el clon *mutS2R2* mediante la transición C1417T, la cual cambia el codón que codifica para Glutamina CAG por un codón de terminación TAG en la posición 473 de WspA. De esta manera, el efecto de la mutación anterior quedaría suprimido debido a que a la proteína resultante le faltan los últimos 69 residuos de aminoácidos, los cuales incluyen precisamente al dominio aceptor de grupos metilo (Figura R21). Posteriormente, el clon SCV *mutS2R3* mostró la presencia de una transición T128C (L43P) en YfiB. Esta mutación ha sido caracterizada como responsable del incremento en la adherencia y conversión al fenotipo SCV en clones de *P. aeruginosa* aislados de muestras de esputo de pacientes con FQ [186] y se ha demostrado que la sustitución L43P genera una activación constitutiva de YfiB, permitiendo el secuestro del represor YfiR. Curiosamente, el complejo YfiB_{L43P}-YfiR es tan fuerte que este alelo de YfiB ha sido seleccionado para el análisis estructural del sistema *yfiBNR* por cristalografía [215]. En un ciclo posterior, la compensación se realiza a través de la mutación G991A, la cual genera el cambio de los aminoácidos E331K YfiN. Dado que esta mutación se localiza en el dominio GGDEF de la DGC, se puede especular que la actividad enzimática se ve afectada, por lo que los niveles de c-di-GMP disminuirían en este clon. Interesantemente, en el clon SCV *mutS2R5* se adquiere una nueva mutación en el gen *wspA*. En este caso, se trata de la transición A1418G la cual genera que el codón de terminación prematuro TAG producido a consecuencia de la mutación obtenida durante el ciclo 2 de evolución, cambie por TGG el cual codifica para el aminoácido Triptófano (*473W). De esta manera, la secuencia de proteínas del receptor WspA se restituye, por lo que el efecto de la mutación en *wspF* obtenida en el ciclo vuelve a tener efecto en la activación constitutiva del sistema de transducción. En el clon *mutS2R6* la compensación se realizó a través de una transición C1067T (A356V) en el dominio Histidín quinasa de WspE (Figura R21). Esta mutación se localiza 2 aminoácidos antes de la descrita para el clon WT2R4, lo cual aporta aún más

evidencias a la posibilidad de reversión del fenotipo SCV a través de mutaciones en este dominio de WspE, probablemente debido a una alteración en su capacidad para transferir el grupo fosfato y así activar a WspR.

3.3.3. Adaptación de *P. aeruginosa* en las 4 líneas evolutivas hipermutadoras.

La posibilidad de que la adaptación de las líneas hipermutadoras esté basada, en los primeros ciclos de evolución, en mutaciones en los genes *wsp* e *yfi* muestra un paralelismo evolutivo notablemente marcado en la adaptación de *P. aeruginosa* a este esquema experimental, independientemente de la hipermutabilidad. Con el objeto de continuar indagando en este fenómeno, seguidamente se realizó un análisis poblacional, en el cual a partir de 10 clones SCV seleccionados al azar desde el biofilm cosechado en el ciclo 1 de evolución de la línea *mutS1*, se amplificó por PCR y se secuenció el fragmento que contiene la transición T713C en el gen *wspF*. Los resultados mostraron que, en contraposición a lo observado en la línea WT1, ninguno de ellos contuvo la mencionada mutación. Este resultado sugiere que, frente a una alta tasa de mutación y una mayor probabilidad de adquirir mutaciones en estos genes, los biofilms estarían conformados por SCVs fenotípicamente similares pero genéticamente diferentes, debido a que se habrían originado por eventos de mutación independientes. En concordancia con estos resultados, es importante en este punto mencionar que en nuestro laboratorio se ha descrito que la emergencia de variantes deficientes en el *quorum sensing* se produce mediante eventos de mutación independientes en el gen *lasR*, particularmente en cepas de *P. aeruginosa* hipermutadoras [149].

Salvando la mayor cantidad de mutaciones acumuladas en cada ciclo de adaptación en las líneas *mutS*, la estrategia adaptativa que emplean las líneas normomutadoras e hipermutadoras para adaptarse a ciclos sucesivos y repetidos de conversión y reversión del morfotipo SCV sería la misma: la adquisición de mutaciones en sistemas que regulan la concentración intracelular del c-di-GMP. Sin embargo, las líneas normomutadoras mostraron una fuerte restricción genética a partir del ciclo 5, con sólo una línea evolutiva que se extendió hasta el ciclo 10 y con frecuencias de conversión y reversión significativamente bajas (Figura R10). Cabe preguntarse entonces, ¿cuál es la base genética mediante la cual

las líneas hipermutadoras se adaptan, sin restricciones aparentes, modulando alternativamente niveles altos y bajos de c-di-GMP a lo largo de los ciclos evolutivos?. Tal como se mencionó anteriormente, *P. aeruginosa* posee 40 genes relacionados a la síntesis y/o degradación del c-di-GMP: 16 genes con dominios GGDEF, 5 con dominios EAL, 16 dominios híbridos GGDEF/EAL y 3 genes con dominios HD-GYP, siendo de esta manera una de las especies bacterianas con mayor número de genes potencialmente involucrados en el metabolismo del c-di-GMP [176,206,216]. Así, una de las posibilidades que explicarían la mayor flexibilidad genética mostrada por las líneas hipermutadoras sería una mayor probabilidad, luego de abolidos los sistemas *wsp* e *yfi*, de mutar otras DGC, FDE y/o otros genes regulatorios relacionados, y así poder continuar, por adquisición de mutaciones compensatorias, modulando los niveles de c-di-GMP. Para abordar esta hipótesis y tal como se observa en la Figura R28, el conjunto de genes mutados en las líneas hipermutadoras secuenciadas en el ciclo 15 de evolución (Tabla R6), fue clasificado en grupos de acuerdo a la potencialidad de estar relacionados funcionalmente con el fenómeno de conversión y reversión al fenotipo SCV. En el primero de ellos, se incluyó a genes que poseen dominios GGDEF/EAL, encontrándose que en total las cepas hipermutadoras se adaptan a través de mutaciones en 7 genes de los 40 genes descritos, entre los que se incluye las DGC YfiN, WspR y PA14_72420; la FDE PA14_14530; y las enzimas híbridas o de actividad dual MorA, BifA y RbdA (Tabla R6, Figura R28). Es interesante remarcar que, de manera similar a lo observado para cepas normomutadoras, la mutagénesis en los genes con dominios DGC y FDE habría sido positivamente seleccionada en este esquema evolutivo. En este sentido, el número de mutaciones esperadas ($N_e=6.5$) respecto al número observado ($N_o=14$), fue notable y estadísticamente diferente (prueba Chi-cuadrado, $X^2_1=11$, $P<0.001$), lo cual permite descartar que hayan ocurrido únicamente por azar (ver Materiales y Métodos). El segundo grupo incluyó genes vinculados con la regulación de enzimas con dominios DGC/FDE (Figura R28). Mientras que el tercer grupo de genes incluyó aquellos que han sido relacionados al fenotipo SCV, ya sea por participar en la motilidad y/o adherencia; por estar relacionados a la síntesis de pili, fimbrias o flagelo, o bien por estar involucrados en la producción de exopolisacáridos (Tabla

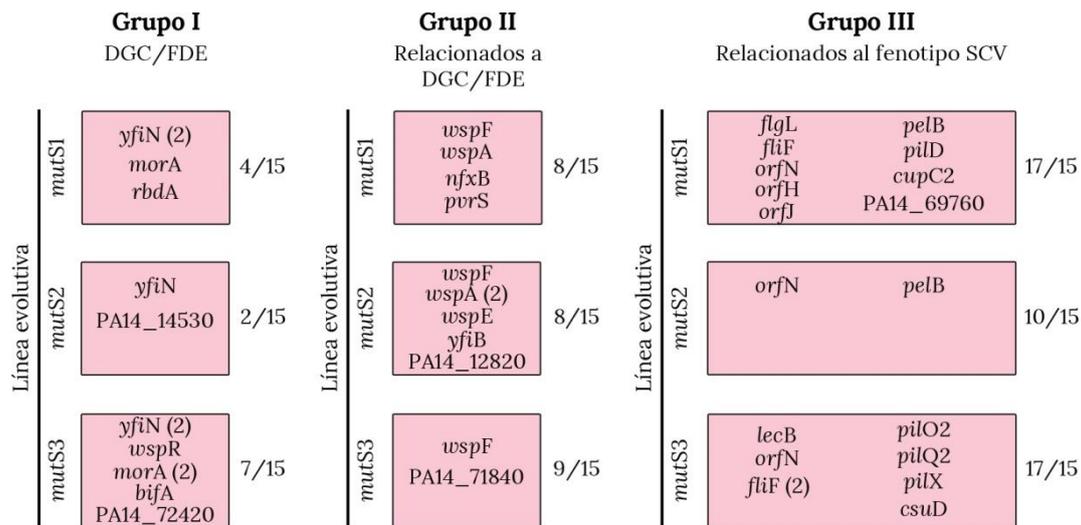


Figura R28: Genes potencialmente involucrados en el proceso de conversión y reversión del fenotipo SCV mutados en las líneas evolutivas hipermutadoras de *P. aeruginosa* secuenciadas en el ciclo 15 de evolución. Los genes fueron seleccionados y clasificados en tres grupos: grupo I: genes con dominios diguanilato ciclasas (DGC) y fosfodiesterasas (FDE); grupo II: genes relacionados a la regulación de enzimas DGC y FDE; y grupo III: genes relacionados a las propiedades fenotípicas del morfotipo SCV, tales como motilidad y adherencia, producción de exopolisacáridos, o biosíntesis de pili, fimbrias y flagelos. La información relacionada a la probable función de los mismos fue extraída de la base de datos Pseudomonas.com. (2) Indica que se ha encontrado dos mutaciones en el mismo gen. A la derecha se indica la relación entre el número de genes mutados que se suman de grupo en grupo (incluyendo el/los grupo/s anterior/es) y el número de ciclos evolutivos transcurridos.

R6, Figura R28). La suma de los genes incluidos en los grupo I y II en cada línea evolutiva, cuya función está probablemente relacionada al metabolismo del c-di-GMP, fue en todos los casos menor a 15, lo cual no es suficiente para explicar la adaptación por un mecanismo de mutaciones compensatorias adquiridas en cada ciclo (Figura R28). El resultado encontrado al sumar las mutaciones clasificadas en los tres grupos de genes en las líneas *mutS1* y *mutS3*, mostró una relación entre mutaciones acumuladas en los 3 grupos y ciclos evolutivos que indica la acumulación de más de una mutación por ciclo, lo cual podría significar que las mutaciones en este tercer grupo de genes tendrían un efecto aditivo en el fenotipo observado, acompañando a la mutación adaptativa clave en una regulación fina o “fine tuning” del proceso, o bien que, sólo especulando que sus funciones tengan una relación con la regulación de los niveles de c-di-GMP aún no determinada, son mutaciones adaptativas que se adquieren de modo compensatorio de una o más de una por ciclo y permiten la conversión y reversión al fenotipo SCV. Sin embargo, en la línea *mutS2*, la suma de los 3 grupos de genes no fue suficiente para

explicar un mecanismo compensatorio semejante (Figura R28) a pesar que la variación a nivel fenotípico fue la misma que la observada en las líneas paralelas *mutS1* y *mutS3*.

Un mecanismo alternativo de adaptación involucraría mutaciones *switch on/off* a través de indels en un mismo gen que contiene SSR. De esta manera, las mutaciones producirían la expansión (estado *off*) y la contracción (estado *on*) del SSR, de forma tal que el gen funcionaría como un interruptor genético. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos demostrado cómo la mutagénesis en cepas hipermutadoras de *P. aeruginosa* está sesgada a una determinada vía génica por la presencia de SSRs de G:C [145,147,148] y cómo la frecuencia de mutación de estas secuencias aumenta en directa relación al tamaño del SSR [145,147]. En concordancia, el espectro de mutación observado para las cepas hipermutadoras en este estudio evidenció la presencia de un $18 \pm 9\%$ de mutaciones de tipo indels localizadas en SSRs principalmente de G:C (Figura R24). Frente a esta alternativa, caben destacar las mutaciones de tipo indels en SSRs de G:C acumuladas en el gen *pvrS* (+1 pb G⁶SSR₆₃₄) en la línea *mutS2*, que codifica para una proteína sensora que controla los niveles de expresión de la FDE PrvR [218] y en la FDE PA14_14530 (+1 pb G⁶SSR₁₅₂₇) en la línea *mutS3* (Tabla R6). La posibilidad de que el aumento y disminución del c-di-GMP consecutivos a lo largo del esquema evolutivo implementado en cepas de *P. aeruginosa* hipermutadoras sea a través de mutaciones *switch on/off* en el mismo gen mediadas por SSRs queda así planteada y da lugar a un nuevo interrogante que podría constituir el punto de partida de futuros estudios.

DISCUSIÓN

Los objetivos de esta tesis doctoral estuvieron enmarcados en el estudio de la interrelación entre las estrategias adaptativas que despliega *P. aeruginosa* y favorecen el desarrollo de las infecciones crónicas en las vías aéreas de pacientes con FQ: el ciclo de formación de biofilms, la diversificación fenotípica y la hipermutabilidad. Como ha sido descrito anteriormente, durante la formación de biofilms las bacterias sintetizan una matriz de exopolisacáridos que permite su adherencia a una superficie, lo cual, junto a la actividad metabólica de las células, favorece la formación de microambientes heterogéneos [83,84]. La adaptación a este estilo de vida se realiza a través de un proceso de diversificación fenotípica, el cual está basado en la adquisición de mutaciones y posterior selección de aquellas que resultan benéficas para cada microambiente particular [78,81,104]. Como consecuencia, las bacterias que crecen en biofilms poseen características morfológicas y metabólicas diferentes a las manifestadas durante el crecimiento planctónico [98,101-103]. Durante la etapa de dispersión del biofilm, se produce una reversión de parte de los rasgos adaptativos adquiridos y las células vuelven a un estadio de vida planctónico. Como un ejemplo de ello, durante la etapa de dispersión, las células readquieren la motilidad mediada por flagelos, frente a la necesidad de desplazarse en búsqueda de mejores condiciones nutricionales [108]. Así, puede decirse que el ciclo de formación de biofilms supone procesos de adaptación y diversificación fenotípica seguidos por procesos de reversión, permitiendo a las bacterias fundar un nuevo biofilm en donde el proceso de especialización y adaptación volvería a producirse. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos demostrado que en *P. aeruginosa*, el aumento en la tasa de mutación incrementa los procesos de diversificación [17,80,145-149], favorece la competitividad en cultivos en biofilms [146] y aumenta la frecuencia de reversión de morfotipos adaptados [148]. En base a estos antecedentes, en este trabajo de tesis se planteó como objetivo indagar en la flexibilidad de *P. aeruginosa* de variar entre dos fases fenotípicas, es decir, diversificar y revertir en forma sucesiva. Al mismo tiempo, se propuso estudiar cuál es la implicancia de la hipermutabilidad en dicho proceso. Para ello, se utilizó como modelo el fenotipo SCV de *P. aeruginosa*, uno de los morfotipos especialistas que emergen durante el crecimiento de la bacteria en biofilms [117-119]. El estudio de este fenotipo resultó interesante a su

vez dado que la base molecular que subyace a su emergencia y reversión no ha sido hasta el momento completamente consensuada [119]. Para el estudio, se diseñó un experimento de evolución *in vitro* el cual estuvo basado en la conversión al fenotipo SCV en cultivos en biofilms, seguida de la reversión a un morfotipo similar al parental en placas de agar. Este ensayo fue realizado de manera repetida y sucesiva, analizando en paralelo líneas evolutivas fundadas a partir de un ancestro normomutador e hipermutador común.

El esquema evolutivo planteado mostró que, si bien el fenómeno de conversión y reversión SCV presentó similitudes en cuanto a las características fenotípicas de las variantes obtenidas en cada evento (Figura R2, R11 y R12), la flexibilidad observada en la adaptación sucesiva y repetida para cepas de *P. aeruginosa* normomutadoras fue significativamente menor en comparación con cepas hipermutadoras (Figura R9 y R10). En este sentido, las 5 líneas paralelas WT analizadas mostraron una clara restricción, la cual fue evidenciada como una disminución de la frecuencia de emergencia de clones SCV a partir del ciclo 5 de evolución. Por el contrario, las líneas evolutivas hipermutadoras se adaptaron al esquema evolutivo impuesto sin mostrar ninguna restricción aparente hasta el ciclo 16 de evolución.

Dado que la central diferencia entre las líneas de *P. aeruginosa* analizadas radica en una tasa de mutación incrementada, la restricción observada en las cepas normomutadoras sería de carácter netamente genético. En este sentido, el análisis de genómica estructural comparativa realizado mediante el secuenciamiento de genomas completos de clones evolucionados y de los respectivos ancestros, determinó que la adaptación sucesiva a la conversión y reversión SCV estuvo basada en la adquisición de mutaciones compensatorias en genes relacionados a la modulación de los niveles intracelulares del segundo mensajero c-di-GMP.

Estudios realizados en los últimos años, permiten centrar a este segundo mensajero como la principal molécula implicada en el ciclo de formación de biofilms, mediando la transición entre este estilo de vida y el planctónico [97,187,188,190-192]. Esta regulación se basa en la modulación de los niveles de c-di-GMP: los cultivos en biofilms exhiben elevados niveles, mientras que los

planctónicos muestran niveles disminuidos de este segundo mensajero. Estos niveles resultan del balance entre su síntesis y degradación, de las cuales participan diguanilato ciclasas (DGC) y fosfodiesterasas (FDE), respectivamente [193,194]. Dentro de las funciones reguladas por este segundo mensajero se incluyen la motilidad, la producción de exopolisacáridos y la adherencia, de forma tal que niveles intracelulares elevados promueven la disminución del movimiento tipo swarming y aumentan la adherencia y expresión de la matriz extracelular del biofilm [188].

Acorde a estos antecedentes, particularmente las líneas normomutadoras mostraron la adquisición de una mutación única por cada ciclo evolutivo que durante los primeros 4 ciclos de evolución, se localizaron en los sistemas de transducción *wsp* e *yfi*. Estos sistemas están formados por múltiples componentes, los cuales regulan la actividad de dos DGC específicas, WspR e YfiN, y han sido previamente relacionados con la emergencia de variantes SCV [122,126]. Notablemente, y en todos los casos, las mutaciones que permiten la conversión a la morfología SCV circunscriben la subsiguiente mutación al mismo sistema y, en algunos casos, al mismo gen modificado inicialmente, de manera que la primera induce la actividad de la DGC correspondiente y la segunda la compensa alterando y/o anulando su actividad. Este modo compensatorio de acumulación de mutaciones se confirma dado que los ciclos de conversión y reversión SCV están determinados por niveles altos y bajos de c-di-GMP, respectivamente (Figura R17). En relación al sistema *wsp*, compuesto por 7 genes que regulan la actividad de la DGC WspR (Figura R20), se encontró que el gen *wspA* fue el más mutado, seguido en igual medida por los genes *wspF* y *wspR*, (Tablas R3 y R6, Figura R21). Dentro de ellas, las mutaciones encontradas en *wspA* participaron tanto de ciclos de conversión como de reversión, mostrando la versatilidad de este receptor en la adaptación a estos procesos opuestos. Por el contrario, los genes *wspF* y *wspR* fueron blancos mutagénicos para la conversión o para reversión del fenotipo SCV, respectivamente. Un trabajo contemporáneo realizado por Cooper y colaboradores, utilizando como modelo a la bacteria *B. cepacia*, determinó que la emergencia de variantes SCV en esta especie está análogamente basada en la adquisición de mutaciones en el sistema de transducción ortólogo a *wsp*,

principalmente en los genes *wspA* y *wspE* [219]. En el mismo sentido, la reversión SCV en *B. cepacia* estaría basada principalmente en mutaciones en el mismo sistema *wsp*, aunque en pequeño porcentaje lo hace a través de la inactivación de genes relacionados a la síntesis de exopolisacáridos [220].

En relación al sistema de transducción *yfi*, complejo formado por 3 proteínas que se localiza entre la membrana externa y la membrana celular (Figura R20), los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la adaptación se produce a través de mutaciones ocurridas principalmente en la DGC YfiN (Tablas R3 y R6, Figura R21). Es más, se observa un fuerte sesgo en la adquisición de mutaciones entre las posiciones 112-231 pb, en donde se localizan 8 de las 12 mutaciones descritas en *yfiN*. Entre estas posiciones se encuentra el dominio PAS de interacción con el represor YfiR [201]. De manera similar a lo observado para *wspA*, las mutaciones en *yfiN* participaron tanto de eventos de conversión como de reversión del fenotipo SCV. Este resultado es interesante, ya que por lo general en aquellos sistemas de transducción de varios componentes, es de esperar que la vía de regulación principal sea la pérdida de función de la proteína represora, en este caso YfiR, en lugar de la ganancia o pérdida de función de la enzima, en este caso YfiN. En el año 2010, Malone y colaboradores describieron el sistema *yfiBNR* en *P. aeruginosa* como un complejo de transducción de señales altamente conservado en γ -proteobacterias y de gran relevancia en la formación de biofilms [120]. En concordancia con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, estos autores caracterizaron 5 clones SCV de *P. aeruginosa* aislados a partir de muestras de esputo de pacientes con FQ, de los cuales 4 se basaron en mutaciones en YfiN que permiten un incremento en su actividad, y un único clon mostró una mutación que genera pérdida de función del represor YfiR [120,184]. En base a estos resultados, Malone y colaboradores sugieren que YfiR probablemente cumpla otras funciones además de la asignada en este sistema, por lo que una pérdida de función de esta proteína represora representaría adicionalmente un costo en el *fitness* en el pulmón FQ. Los resultados expuestos en el presente trabajo aportan nuevas evidencias que destacan la importancia que poseen los sistemas de transducción de señales *wsp* e *yfi*, particularmente en la adaptación sucesiva a los procesos opuestos de conversión y reversión SCV en *P. aeruginosa*.

El fuerte paralelismo evolutivo encontrado en la mutagénesis de los sistemas de transducción de señales *wsp* e *yfi*, indica que estos sistemas corresponden a vías genéticas con mayor probabilidad de ser mutados respecto a otras (Tabla R3 y R7). Como se mencionó anteriormente, el genoma de *P. aeruginosa* codifica para alrededor de 40 genes que contienen en sus secuencias dominios conservados denominados GGDEF, EAL y HD-GYP, las cuales estarían involucradas en el metabolismo del segundo mensajero c-di-GMP [176,206,216]. En base a estas observaciones, ¿por qué los sistemas de transducción *wsp* e *yfi* representan las vías génicas predilectas para la adaptación a este diseño experimental, siendo que *P. aeruginosa* posee una potencial redundancia de genes a través de los cuales podría dar una misma respuesta fenotípica: elevar y disminuir los niveles de c-di-GMP? Una posible explicación se desprende del trabajo publicado por Kulasakara y colaboradores [216], el cual permite hipotetizar que este fenómeno estaría relacionado con los niveles o grados de actividad enzimática que cada una de las DGC y FDE posee. Estos autores determinaron la actividad de cada una de estas enzimas mediante la sobreexpresión de todos los genes con dominios DGC y/o FDE presentes en la cepa *P. aeruginosa* PAO1 y la posterior determinación de los niveles de c-di-GMP resultantes mediante HPLC [216]. En el orden de actividad de las DGC establecido por estos autores, WspR es la DGC de mayor actividad, seguida inmediatamente de YfiN. De esta manera, la mayor frecuencia de mutación en los genes pertenecientes a los sistemas *wsp* e *yfi* podría estar relacionada al nivel de actividad enzimática que poseen sus DGC correspondientes. En otras palabras, la modulación de aquellas enzimas de altos niveles de actividad, en este caso a través de mutaciones, brinda un cambio fenotípico más rápido como respuesta adaptativa frente al cambio de ambiente o condición. PA14_72420 es la tercera DGC de mayor actividad [216]. Acorde a este orden, esta enzima se muta en el ciclo 5 de conversión SCV de la WT2, una vez anulados los sistemas *wsp* e *yfi* en los primeros ciclos. Igualmente, la línea *mutS3* acumula una mutación en este gen que participaría en algún ciclo de conversión/reversión a partir del ciclo 5. Siguiendo la misma lógica y respecto a las FDE, las enzimas de mayor actividad fueron PvrR y PA14_12810, cuyo regulador PvrS y la misma PA14_12820 fueron mutados en este estudio, seguidas

inmediatamente de la FDE PA14_14530 igualmente implicada en este experimento de evolución (Tabla R6). Por su lado, en el estudio mencionado, las enzimas duales no presentaron actividad, probablemente debido a interferencias relacionadas a la presencia de ambos dominios catalíticos en la secuencia de ADN [216]. No se descarta entonces que la ocurrencia de mutaciones aquí determinadas en las enzimas duales MorA, BifA, RbdA pueda estar relacionada con los grados de actividad (Tabla R6).

Tal cual lo esperado, el número de mutaciones acumuladas en las líneas hipermutadoras fue significativamente mayor, alcanzando un promedio de 20 mutaciones por ciclo. A pesar de que las funciones codificadas por estos genes fue muy diversa (Figura R25), centrando el análisis en los genes que participan en la regulación de los niveles de c-di-GMP, se observa que, en los primeros ciclos de evolución, se acumulan mutaciones en los sistemas *wsp* e *yfi* con una frecuencia de 1 mutación por ciclo, de manera equivalente a lo observado en las normomutadoras. Dado que los niveles de c-di-GMP igualmente aumentan y disminuyen alternativamente en los ciclos de conversión y reversión, respectivamente (Figura R27), estos resultados sugieren que mientras estas mutaciones constituyen la base de la adaptación y variación fenotípica, el resto, acumuladas como directa consecuencia de la elevada tasa de mutación, tendría o bien un efecto neutro, o bien un efecto aditivo a través de una regulación fina o “*fine tuning*” del proceso de conversión y reversión al fenotipo SCV.

Tal como se mencionó anteriormente en las líneas normomutadoras, la elevada frecuencia de conversión al fenotipo SCV en los primeros cuatro ciclos de evolución coincide con la participación de los sistemas *wsp* e *yfi*. Una vez que ambos sistemas de transducción se encuentran alterados o abolidos en el ciclo 4 de evolución, la frecuencia de conversión SCV disminuye significativamente, dando cuenta de una clara restricción genética. Esta restricción no fue observada en ninguna de las líneas *mutS* estudiadas, las cuales evolucionaron a lo largo de 16 ciclos sin mostrar disminución en las frecuencias de conversión y reversión. La pregunta que surge a partir de esta observación es: ¿Cuál es el mecanismo molecular que explica una adaptación sin restricciones genéticas aparentes en las cepas hipermutadoras?

Una primera posibilidad es que la mayor tasa de mutación aumenta la probabilidad de mutar nuevos genes implicados en el metabolismo del c-di-GMP, brindando mayor acceso a distintos recursos genéticos disponibles y necesarios para la adaptación. El camino adaptativo se daría entonces a través de mutaciones compensatorias en estos genes, al igual que lo que sucede en los primeros ciclos de evolución. En este sentido, si bien se determinó un número importante de genes potencialmente implicados en la conversión y reversión del fenotipo SCV (Tabla R6, Figura 28), el número de candidatos encontrados resulta ser menor al número de ciclos evolutivos a los cuales la bacterias se adaptó (Figura R28). De esta manera, si la adaptación de las hipermutadoras se basara en mutaciones compensatorias, las mismas estarían afectando genes cuya función relacionada al metabolismo del c-di-GMP no habría sido al momento dilucidada. Si bien, por predicción *P. aeruginosa* posee 40 DGC y FDE codificadas en su genoma [176,206,216], poco se conoce acerca de los genes que podrían estar participando en la regulación de estas enzimas, los cuales también permitirían una modificación de los niveles del c-di-GMP. Así, la cascada de regulación de los niveles intracelulares del c-di-GMP adquiere una gran complejidad con muchos genes y vías génicas implicadas aún desconocidas. A esto se suma que, en principio, su predicción no resultaría sencilla, teniendo en cuenta que estos genes regulatorios no necesariamente formarían parte del mismo operón. Como ejemplo de ello, puede citarse al regulador de respuesta RcsB, el cual a pesar de estar localizado en un lugar distal en el genoma, regula específicamente la actividad de la FDE PvrR [218,221]. Otro ejemplo lo ilustra un trabajo recientemente publicado que describe una mutación en la región 5'UTR del RNAm correspondiente al cluster *accBC*, el cual codifica para enzimas involucradas en la biosíntesis de ácidos grasos de membrana celular [222]. Esta mutación incrementa la proporción de ácidos grasos de cadena corta en la membrana plasmática y este cambio genera una señal de activación constitutiva para el sistema de transducción *wsp* [222]. En síntesis, el mapa metabólico asociado al c-di-GMP es muy complejo y altamente regulado, y es actual objeto de estudios que continuamente aportan evidencias que vinculan genes, hasta el momento de función desconocida o genes anteriormente descriptos, a los que se les asigna una nueva función vinculada al mismo. Es por

esta razón, que no se descarta que dentro del conjunto de genes mutados determinados mediante el secuenciamiento de genomas completos en las líneas hipermutadoras se incluyan genes que estén participando en la modulación del c-di-GMP, pero que hasta el momento no han sido caracterizados. En este sentido, cabe destacar que un 22% de los genes identificados en las secuencias genómicas de los clones de *P. aeruginosa* hipermutadores no poseen dominios conocidos o una función asignada que permita una vinculación directa o probable con el metabolismo del c-di-GMP.

Una segunda explicación sería que la conversión y reversión sucesiva al fenotipo SCV en hipermutadoras, en los primeros ciclos se daría por mutaciones compensatorias para luego basarse en un mecanismo de variación de fase. La variación de fase, en la mayoría de los casos, implica la presencia de mutaciones en un único gen que resulta ser clave para la regulación de dos estadios fenotípicos que permiten la adaptación a dos ambientes diferentes [173,175]. Por lo general, la alta prevalencia de mutaciones en estos genes, denominados genes contingentes, está relacionada a las propiedades intrínsecas de la secuencia del gen, como por ejemplo, la presencia de repeticiones simples del ADN (SSRs), que funcionan como puntos calientes de mutación [175]. La tasa de mutación en los SSRs es elevada, por lo que se define un tipo de hipermutabilidad, la localizada, donde el mecanismo mutagénico está basado en pequeñas indels introducidas a través del patinado de la ADN polimerasa durante el proceso de replicación. Estos errores producen apareamientos inadecuados por desplazamiento de las cadenas de ADN y consecuentemente conllevan a cambios en el marco de lectura [223,224]. El mecanismo supone así que la inserción o delección de, por ejemplo, 1 pb en un SSR que altera o “apaga” la función del gen en una de las fases, es subsecuentemente revertida por una delección o inserción en el mismo SSR, de manera de restaurar o volver a “encender” la función del gen. Es por ello que las variaciones de fase están basadas en mutaciones *switch on-off* en genes contingentes [223]. Ejemplos clásicos de variación de fase los brinda el patógeno estricto *Neisseria meningitidis*, el cual sufre cambios fenotípicos al momento de ingresar al huésped a través de la mutación en genes contingentes claves para su adaptación y establecimiento de la infección [225,226]. Sin embargo, fenómenos de variación de fase en el patógeno

oportunista *P. aeruginosa* no han sido hasta el momento descriptos. Trabajos previos desarrollados en nuestro laboratorio determinan que las mutaciones de tipo indels en cepas hipermutadoras, tanto en experimentos *in vitro* como en aisladas de pacientes con FQ, está sesgado a SSRs homopoliméricas de G:C [17,145]. Este espectro de mutación se confirma en este trabajo (Figura R24), y permite especular que, en un contexto hipermutador *P. aeruginosa* podría valerse de un mecanismo molecular de variación de fase para adaptarse rápidamente al régimen de conversión/reversión del morfotipo SCV impuesto. Tal cual lo previamente mencionado, en los primeros ciclos de evolución, el mecanismo de conversión/reversión SCV implica la adquisición de mutaciones compensatorias, en los sistemas *wsp* e *yfi* basadas en un espectro de mutación dominado por transiciones (Tabla R6). En dos líneas evolutivas, sin embargo, se observa la ocurrencia de indels en SSRs G:C: una en la región codificante de la FDE PA14_14530 y la segunda en el gen *pvrS* regulador de la FDE *pvrR*, abriendo la posibilidad de que los mismos constituyan la base de un mecanismo de variación de fase a través del cual poder convertirse y revertirse de manera indefinida. El reciente trabajo liderado por Rainey y colaboradores, aporta evidencias relacionadas a cómo este mecanismo es posible en un contexto hipermutador. Estos autores analizan la conversión al morfotipo “*wrinkly spreader*” (WS) en *P. fluorescens*, la cual corresponde a una morfología de colonias caracterizada por su aspecto rugoso, que si bien posee un tamaño equivalente a la morfología silvestre, la base molecular de su emergencia está igualmente relacionada al incremento en los niveles de c-di-GMP [227,228]. Los autores describen la emergencia de un clon WS a consecuencia de una mutación de -1 pb G^7SSR_{742} , del gen *wspR*, el cual a su vez exhibe un fenotipo hipermutador debido a un SNP en el gen *mutS* [229]. Este clon WS e hipermutador de *P. fluorescens* fue capaz de realizar un proceso de conversión y reversión del fenotipo WS a través de mutaciones ± 1 pb que producen la expansión (estado *off*) o contracción (estado *on*) del G^7SSR_{742} en esta DGC [241]. Es importante destacar que el G^7SSR_{742} descrito para *P. fluorescens* no se encuentra presente en el gen *wspR* perteneciente a *P. aeruginosa*, indicando que en esta especie no habría ningún punto caliente de mutagénesis distinguible en este sistema. De esta manera, la posibilidad de que algún otro gen, dentro del

conjunto de genes relacionados con el c-di-GMP que albergan mutaciones ocurridas en SSRs en las líneas evolutivas hipermutadoras, pueda funcionar como un interruptor genético queda como una pregunta abierta a abordar en el futuro.

Una tercera posibilidad para explicar la diferencia en la flexibilidad en la conversión y reversión SCV entre cepas WT y *mutS*, radica en la mayor probabilidad que poseen las cepas hipermutadoras de adaptarse a través de la adquisición de mecanismos moleculares más complejos, tales como captura de promotores mediante fusiones génicas, reareglos génicos como inversiones; o bien a través de dobles o triples mutantes, entre otros. Un trabajo recientemente publicado por Lind y colaboradores [207], muestran que las vías de conversión al morfotipo WS en *P. fluorescens* involucran a las proteínas WspF, AwsX (ortólogo a YfiR) y MwsR (ortólogo a MorA) [227], pero que cepas mutantes en las que los sistemas de transducción *wsp* y *aws*, así como el gen *mwsR* han sido deletados, las células pueden generar colonias WS con mucha menor probabilidad, ya que requieren de mecanismos moleculares más complejos, tales como las mencionadas fusiones génicas y captura de promotores, o la presencia de dos mutaciones o más de manera simultánea [207].

Un concepto interesante que surge del trabajo de Lind y colaboradores es el de arquitectura del genoma [207]. Este concepto se establece en base a un orden jerárquico de los genes o vías génicas en función del mecanismo molecular que se requiere para que cada uno se constituya como la base de la respuesta fenotípica que conlleva a una determinada adaptación, en este caso incrementar los niveles del c-di-GMP. Dentro del orden jerárquico descrito, la posibilidad de lograr este proceso a través de la pérdida de función de reguladores negativos, es la de mayor probabilidad. Este es el caso de la conversión al fenotipo SCV observada en el presente estudio, la que en los ciclos 1 y 3, se produce a través de mutaciones en los genes reguladores *wspA*, *wspF*, *wspE*, *wspC*, *yfiR* e *yfiB* (Tablas R3 y R7). El mismo ejemplo se puede dar con la conversión al fenotipo mucoso, en donde la mutación del regulador negativo *mucA* es la vía génica predilecta tanto *in vitro* [147,148,230] como *in vivo* [80,167,171,231,232]. La segunda categoría en este orden jerárquico la constituyen mutaciones intragénicas en dominios que cumplen un rol regulatorio negativo de la actividad de enzimas DGC y FDE. Un ejemplo propuesto

por los autores es la DGC PFLU0085 en *P. fluorescens*, la cual posee un dominio de regulación negativa dentro de su propia secuencia, de manera que mutaciones que lo alteran permiten la activación de la enzima. El gen ortólogo en *P. aeruginosa* es PA14_72420 y de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, este gen adquiere una delección en este dominio regulatorio que es la responsable de la emergencia del fenotipo SCV en el clon WT2R5 (Tabla R3). Del mismo modo, las mutaciones dentro de la secuencia de la enzima dual MorA adquiridas tanto en la línea normomutadora WT3 (Tablas R3) así como en las hipermutadoras *mutS1* y *mutS3* (Tabla R6), quedan incluidas dentro de esta categoría. Dentro de esta arquitectura, la siguiente categoría la constituye la activación de genes, la cual se puede realizar a través de fusiones génicas, ya sea por un mecanismo de captura de promotores o bien debido a que estas mutaciones cambian las conexiones regulatorias y funcionales de la proteína resultando en una activación [207]. Con menor probabilidad aún se encuentran los mecanismos que permiten la respuesta fenotípica a través de mutaciones intragénicas que consecuentemente producen la activación de enzimas [207]. En esta categoría se incluirían las mutaciones obtenidas en *yfiN*, las cuales a pesar de la baja probabilidad de ocurrencia establecida por estos autores, en el presente estudio constituye uno de los principales genes involucrados en el mecanismo de conversión SCV en *P. aeruginosa* (Tablas R3 y R7, Figura R21). En esta categoría, *wspR* no estaría incluida, ya que las mutaciones en este gen han sido determinadas de manera exclusiva en eventos de reversión, donde claramente las mutaciones generan pérdida de función de la enzima (Figura R21). La vía genética considerada de menor probabilidad en el trabajo de Lind y colaboradores, incluye la participación de dos mutaciones o más adquiridas de manera simultánea [207]. En este último caso, la emergencia de los clones dobles o triples mutantes poseen una probabilidad de ocurrencia muy baja directamente relacionada a la tasa de mutación de la célula [207,233], por lo que su incremento en cepas hipermutadoras la incrementaría en forma consecuente.

El trabajo de Lind y colaboradores ofrece un marco teórico interesante en base al cual poder explicar por qué se produce una restricción genética en las líneas normomutadoras y cómo un incremento en la tasa de mutación puede

favorecer a superarla. Claramente la mayor probabilidad de conversión y reversión SCV y el alto grado de paralelismo evolutivo en los primeros ciclos de evolución, se basa en el alto número de reguladores negativos extra e intragénicos que ofrecen los sistemas *wsp* e *yfi*. Una vez utilizados estos recursos genéticos, la probabilidad de continuar variando fenotípicamente disminuye dada la menor probabilidad de acceder al resto de genes, los cuales, aunque igualmente implicados en el metabolismo del c-di-GMP, están comprendidos en otras de las categorías definidas en esta arquitectura. Es importante en este punto mencionar, que en esta arquitectura no está contemplada la presencia de un sesgo mutacional determinado por la presencia de SSRs [207]. En este caso, si existiera un SSR vinculado a la conversión al fenotipo SCV, este incrementaría la probabilidad de dar la respuesta fenotípica, la hipermutabilidad sería en este camino netamente ventajosa. Así y nuevamente, tanto el aumento de la tasa como el espectro particular que presenta una célula hipermutadora deficiente en el MRS, aumentaría la probabilidad y por tanto el acceso a aquellos recursos genéticos que el genoma ofrece para sostener la variación fenotípica.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo aportan nuevas evidencias para el mejor entendimiento de las bases moleculares que subyacen la increíble versatilidad que despliega *P. aeruginosa*. Particularmente, en lo que se refiere al crecimiento en biofilms y la diversificación fenotípica a él asociada, brinda interesantes aportes de los mecanismos genéticos que la bacteria utiliza para la conversión y reversión a fenotipos adaptados y el efecto que en estos procesos tiene la hipermutabilidad por deficiencia en el MRS. Considerando la relevancia recientemente descubierta del c-di-GMP como molécula clave en el ciclo de formación de biofilms en *P. aeruginosa* [97,187,188,190-192], estudios recientes proponen a este segundo mensajero así como a las DGC y FDE en su síntesis involucradas como blancos terapéuticos con el propósito de bloquear la formación de biofilms *in vivo* y así, el desarrollo de las infecciones crónicas asociadas a este patógeno oportunista [219-233].

De esta manera, los aportes de este trabajo suman relevante información para el necesario avance en el conocimiento de las estrategias adaptativas utilizadas por *P. aeruginosa*, el cual es crucial para el desarrollo de nuevas

herramientas terapéuticas que permitan el control de las infecciones causadas por esta especie bacteriana.

CONCLUSIONES

La pregunta central del presente trabajo estuvo dirigida a indagar sobre la flexibilidad genética que posee el patógeno oportunista *P. aeruginosa* para la conversión y reversión sucesivas a fenotipos adaptados al biofilm y evaluar sobre el efecto de un incremento en la tasa de mutación en dicho proceso. Así, el estudio brinda mayores evidencias de la interrelación existente entre el ciclo de formación de biofilms, el proceso de diversificación fenotípica y la hipermutabilidad, aportando resultados que pueden resumirse en las siguientes conclusiones:

i) Mientras las propiedades fenotípicas de las variantes parentales, SCV y revertidas fueron similares, la diversificación fenotípica observada en cultivos en biofilms y el valor de frecuencia de reversión del fenotipo SCV fueron notablemente mayores en la cepa hipermutadora *mutS* con respecto a la cepa WT.

ii) Existe una fuerte restricción genética en la conversión al fenotipo SCV en cepas WT a partir del ciclo 5 de evolución, que es superada en cepas hipermutadoras *mutS* las cuales pudieron adaptarse incluso hasta 16 ciclos de evolución consecutivos.

iii) La base molecular que subyace al fenómeno de conversión y reversión SCV consiste en la adquisición de mutaciones compensatorias en genes que modulan los niveles del segundo mensajero c-di-GMP, a través de la regulación de la actividad de enzimas DGC y FDE.

iv) Existe un fuerte paralelismo evolutivo en la mutagénesis de los sistemas *wsp* e *yfi* que regulan la actividad de las DGC WspR e YfiN correspondientes en los primeros 4 ciclos de evolución tanto en las cepas normomutadoras como en hipermutadoras.

v) La conversión/reversión al fenotipo SCV a partir del ciclo 5 de evolución involucra la participación de otras DGC, FDE o proteínas regulatorias

relacionadas tales como MorA, PA14_72420, a las que las hipermutadoras sumaron RbdA, PvrS, BifA, PA14_14530, PA14_12820 y PA14_71840.

vi) En los ciclos finales de evolución, la conversión/reversión al fenotipo SCV en las líneas hipermutadoras se realizaría a través de la adquisición de dos o más mutaciones compensatorias o mediante el *switch on/off* en secuencias SSRs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo.

Las cepas bacterianas, los plásmidos y los oligonucleótidos empleados en este estudio están detallados en las Tablas M1 y M2. La cepa de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 y su mutante isogénica *mutS* (PA14 *mutS*::MAR2xT7 [234]) fueron gentilmente provistas por la Dra. Eliana Drenkard del Massachusetts General Hospital, Boston, USA.

Tabla M1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepas y plásmidos	Genotipo, características relevantes ¹	Fuente o referencia
<i>P. aeruginosa</i>		
UCBPP-PA14	Silvestre, UCBPP-PA14, aislado clínico	[234]
UCBPP-PA14 <i>mutS</i>	$\Delta mutS$; Gm ^r	[234]
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Huésped para la manipulación del ADN	Invitrogen
XL1-Blue AKN67	Posee el plásmido pBK-miniTn7-gfp3, Km ^r , Cm ^r , Sm ^r	[235]
SM10:: λ pir AKN68	Posee al plásmido pUXBF13 el cual provee la transposasa en la conjugación tetratápental. Amp ^r .	[236]
HB101 pRK600	Posee al plásmido pRK600 que codifica para los genes necesarios para la movilización. Cm ^r	[237]
Plásmidos		
p3	pBBR1MCS-3, Tc ^r	[182]
p3:: <i>mutS</i>	pBBR1MCS-3, conteniendo el gen <i>mutS</i> de <i>P. aeruginosa</i> , Tc ^r	Este estudio
pJN105	Vector conteniendo el promotor inducible araBAD, Gm ^r	[200]
pJN2133	pJN105 conteniendo el gen PA2133, Gm ^r	[238]
pJNwspR	pJN105 conteniendo el gen PA14_16500, Gm ^r	Este estudio
pJN105-Tc	pJN105, Gmr , Tc ^r	Este estudio
pJN2133-Tc	pJN2133, Gmr , Tc ^r	Este estudio

¹ Gm^r: resistencia a gentamicina, Km^r: resistencia a kanamicina; Cm^r: resistencia a cloranfenicol; Sm^r: resistencia a estreptomycin; Amp^r: resistencia a ampicilina; Tc^r: resistencia a tetraciclina.

Para el cultivo rutinario de bacterias se utilizó el medio rico Luria-Bertani (LB) compuesto por: 10,0 g/l peptona de caseína (Britania, Argentina), 5,0 g/l extracto de levadura (Britania, Argentina) y 10,0 g/l NaCl (Cicarelli, Argentina). Para obtener los medios de cultivo sólidos se adicionó 10 g/l agar-agar (Britania, Argentina). Los cultivos líquidos fueron incubados en condiciones de agitación constante a 220 rpm y 37°C, mientras que las placas de agar fueron incubadas en estufas de cultivo microbiológico a 37°C. El tiempo de incubación fue de 16-18 h (ON) a menos que se especifique de otra manera. Todas las cepas bacterianas fueron conservadas en stocks de glicerol al 15% congelados a -80°C. Los antibióticos se utilizaron en las siguientes concentraciones: 40 μ g/ml de gentamicina (Gm); 30 μ g/ml de tetraciclina (Tc); 500 μ g/ml de estreptomycin

(Sm), 100 µg/ml de ampicilina (Amp), 6 µg/ml de cloranfenicol (Cm) y 25 µg/ml de kanamicina (km).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para los pasos de amplificación por PCR se utilizaron ciclos de temperatura generales, los cuales consistieron en: 1 ciclo de 5 min a 95°C; 33 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C y 50 s a 72°C y un ciclo de 10 min a 72°C. Como templado de la reacción se utilizó entre 1 ng y 1 µg de ADN genómico extraído mediante el kit comercial Wizard® (Promega, USA). Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en presencia de 5% de dimetilsulfóxido (Cicarelli, Argentina). Para confirmar la correcta amplificación del fragmento deseado y determinar la cantidad de producto formado, 1 µl del volumen de reacción fue analizado rutinariamente mediante una corrida electroforética en geles de agarosa al 1%.

Caracterización fenotípica de los clones de *P. aeruginosa*.

Con el objetivo de determinar la morfología de colonias, se realizaron cultivos líquidos ON inoculados con cada clon de *P. aeruginosa* a evaluar. Diluciones apropiadas de estos cultivos fueron sembradas en placas de LB agar e incubadas a 37°C durante 24 h. Las colonias obtenidas fueron inspeccionadas visualmente y fotografiadas utilizando una cámara digital AxioCam (Zeiss, Alemania) acoplada a un microscopio directo Axioplan (Zeiss, Alemania) equipado con un objetivo Plan CN 4X (Olympus, Japón).

Para la determinación de la producción de exopolisacáridos en cada variante morfotípica, las bacterias fueron crecidas en placas de agar rojo Congo cuya composición fue: 10 g/l triptona de caseína (Britania, Argentina); 40 µg/ml rojo Congo (Sigma Aldrich, USA); 20 µg/ml azul brillante de Comassie (Sigma Aldrich, USA) y 10 g/l agar (Britania, Argentina). Posterior al sembrado de las células, las placas fueron incubadas durante 4 días a temperatura ambiente. Las colonias fueron fotografiadas utilizando una cámara digital XZ-1 (Olympus, Japón).

Para analizar la producción de biofilms y la autoagregación las bacterias fueron crecidas en tubos de ensayo conteniendo 3 ml de caldo LB e incubados ON

a 37°C en agitación constante. Posteriormente, los tubos fueron mantenidos durante 3 h adicionales en condiciones estáticas a temperatura ambiente. La producción de biofilms se evidenció como la presencia de un anillo de crecimiento microbiano adherido al vidrio, mientras que la autoagregación se observó como el grado de translucidez del cultivo, el cual fue cuantificado en relación a los niveles de sedimentación de las células mediante la medida diferencial de la densidad óptica (DO) a 600 nm antes y después de la incubación estática. Para la cuantificación de la producción de biofilms de los clones de *P. aeruginosa*, se procedió de acuerdo al método de coloración por cristal violeta [239] en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Austria). Para ello, cada pocillo fue inoculado con 100 µl de una suspensión de 1.5×10^5 células en caldo LB y las microplacas fueron incubadas estáticamente durante 24 h a 37°C. En estas condiciones las bacterias crecen adheridas al plástico y el biofilm se evidencia como un anillo de crecimiento cuando el cultivo no adherido (crecimiento planctónico) es removido suavemente. Transcurrido el tiempo de incubación, las células planctónicas fueron descartadas por inversión de la microplaca sobre papel absorbente. Los pocillos fueron lavados con 100 µl de NaCl 0.9%. El biofilm adherido fue teñido con 100 µl de cristal violeta 0.1% (Sigma-Aldrich, USA) durante 15 min. El colorante fue eliminado por inversión seguida de 2 lavados con 100 µl de NaCl 0.9%. Por último, el cristal violeta adsorbido por las células fue resuspendido mediante el agregado de 100 µl de etanol 96% (Cicarelli, Argentina) durante 15 min. La absorbancia de cada pocillo fue determinada a través de la medida de la DO a 595 nm utilizando un lector de microplacas Epoch (BioTek, USA). Cada cepa fue evaluada por octuplicado.

La motilidad mediada por flagelos (*swarming*) fue determinada mediante ensayos en placas de agar M8, compuesto por 3.4 g/l Na₂PO₄ (Cicarelli, Argentina), 1.5 g/l KH₂PO₄ (Cicarelli, Argentina) y 0.25 g/l NaCl (Cicarelli, Argentina), el cual fue suplementado con 0.5% de casamino ácidos (Britania, Argentina), 1 mM de MgSO₄ (Cicarelli, Argentina) y 0.2% de glucosa (Cicarelli, Argentina). Se utilizó agar-agar al 0.5% para solidificar el medio de cultivo. Las placas fueron inoculadas utilizando un palillo a partir de colonias únicas previamente crecidas en placas de LB agar. Posteriormente, las placas M8 fueron

incubadas durante 48 h a 37°C. El diámetro del movimiento fue medido y expresado en centímetros (cm).

Cultivos en biofilms y determinación de la diversificación fenotípica.

Las células fueron crecidas en medios de cultivo LB en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Austria). Los cultivos fueron inicialmente inoculados con 200 µl de una suspensión conteniendo entre 10-100 células obtenidas a partir de diluciones apropiadas en caldo LB de un cultivo líquido saturado obtenido por incubación ON con agitación a 37 °C. Un inóculo de este tamaño permitió reducir a un máximo la posibilidad de inocular los cultivos con células que hubieran sufrido algún tipo de modificación o diversificación previa. Alícuotas de la suspensión inicial fueron sembradas en placas de LB agar e incubadas apropiadamente con el fin de evaluar la morfología de colonias inicial y corroborar el número de células inoculadas. Las microplacas se incubaron en condiciones estáticas a 37 °C durante 4 días. El medio de cultivo fue renovado diariamente mediante el descarte del anterior y el agregado de 200 µl de caldo LB fresco. Posteriormente, el biofilm adherido a la pared del pocillo fue cosechado mediante el raspaje utilizando una varilla de vidrio, resuspendido en un volumen final de 200 µl de caldo LB fresco y conservado mediante el agregado de 200 µl de leche descremada al 10% y congelado a -80°C.

Para evaluar la morfología de colonias presentes en el cultivo en biofilm, se sembraron diluciones seriadas del material resuspendido en placas de agar LB, las cuales fueron incubadas en estufa a 37°C durante 24 h. La diversidad fenotípica del biofilm fue determinada mediante el índice H de Shannon-Weaver expresado como $H = (N \log N - \sum n \log n) / N$, en donde N es el número total de individuos y n es el número de individuos correspondientes a cada morfotipo, siendo H un valor adimensional comprendido entre 0-1. De esta manera, el índice H refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de morfotipos presentes y su abundancia relativa, indicando una mayor heterogeneidad con valores tendientes a 1.

Tabla M2. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Oligonucleótidos	Secuencia (5'- 3') ¹	Fuente o referencia
PTn7R	CACAGCATAACTGGACTGATTTTC	[240]
PglmS-down	GCACATCGGCGACGTGCTCTC	[240]
wspR- EcoRI For	GATGAATTCATGCACAACCCTCAT	Este estudio
wspR-XbaI Rev	TCTCTAGAGAGGTCCTTGATGCTG	Este estudio
wspA 1406876 For	CGGCAACATCAACCAGGTG	Este estudio
wspA 1406876 Rev	CCTCGGAGAACTTGTCAT	Este estudio
wspA F1	TTGTGGCGGCAGGAACGAATC	Este estudio
wspA R1	GGCGATGTCCTTGTTTACAG	Este estudio
wspA F2	CTGAACAAGGACATCGCC	Este estudio
wspA R2	GCCTTCTCGTTGAGGATCGC	Este estudio
wspA F3	CGGCAACATCAACCAGGTG	Este estudio
wspA R3	AGCGGGACACGGTCACA	Este estudio
wspR F2	CTCCAACCGTCGTAC	Este estudio
wspR R2	CGCCACTCAGCCCGCC	Este estudio
wspR F1	CATGATCGGAGAGGCTGTGC	Este estudio
wspR R1	CGAAGTGACGACGGTTGGAG	Este estudio
wspF F1	ATCGGAATCGTCAATGA	Este estudio
wspF R1	CCTTCGGCGGCACCACCT	Este estudio
wspF F2	AGCGTCTGGTGGCGAT	Este estudio
wspF R2	GCGATGGTGAGGAAGC	Este estudio
wspF F3	CCAGCGAATCGAAGCTGCCG	Este estudio
wspF R3	GTTCCACGCACCGCCACG	Este estudio
wspC F1	ATTGCTGCCCCGACGAAGT	Este estudio
wspC R1	GCGAAACCCCAGTTCA	Este estudio
wspD F2	TCGCCTGCCTTTCCT	Este estudio
wspD R2	CAATCCTCCATGACGTGC	Este estudio
wspR 1413318 For	GGTGCCTGGAACAGCATTCAA	Este estudio
wspR 1413318 Rev	TCGGCTCTTCCTTGGTGC	Este estudio
wspE 1410052 For	ATGGAGGATTGCCTGGTGG	Este estudio
wspE 1410052 Rev	CTCGTCGTTGCTCGTCTGCT	Este estudio
morA For	GCTACATCGTCCAGGTCAAC	Este estudio
morA Rev	AGGAACATCAGCACCACCCAC	Este estudio
morA 5431831 For	CTTCGTCTGCTTCTTACAG	Este estudio
morA 5431831 Rev	AGGTCGCTTTCCAGTTCC	Este estudio
morA 5430523 For	GAAGGGTTCGGCGTGG	Este estudio
morA 5430523 Rev	GTTCTTCCTGGTTGTAGCCC	Este estudio
yfiN F1	TGATGAACCGTCGTCTCGC	Este estudio
yfiN R1	CACCGAACCGATCTTCTGGC	Este estudio
yfiN F2	TCGGTGGAGGTGAAAGGCT	Este estudio
yfiN R2	GCGGTCGTTGATCTCCTTG	Este estudio
yfiN F3	AAGGAGATCAACGACCGCC	Este estudio
yfiN R3	CTACTTGGGTGGAGCCTCTG	Este estudio
yfiB 4436837 For	AGGAGATAGACAGTGTACC	Este estudio
yfiB 4436837 Rev	ATCTTCGTCAGGGTGTGCG	Este estudio
nfxB F2	GACAGCAGAAAGGCGTGT	Este estudio
nfxB R2	TCAGGGACAGGCGGTCTG	Este estudio
yfiR F	GCACACCGACTACACTGGC	Este estudio
yfiR R	GCAGCGATGGATTGGAACC	Este estudio
yfiB F	AGGAGATAGACAGTGTACC	Este estudio
yfiB R	GCAGGATTACTCGGCGGGA	Este estudio
yfiB F2	TGGCGAACTCAACGACC	Este estudio
yfiB R2	GCAGGATTACTCGGCGGGA	Este estudio
Tc-NcoI For	GCGCCATGGATAAAAAATAGGCGTATCACG	Este estudio
Tc-ApaI Rev	ATAGGGCCCCGCTCACTGCCCGCTTT	Este estudio

Ensayo de reversión del morfotipo SCV en placas de agar.

Para los ensayos de reversión, una colonia SCV fue resuspendida en 100 μ l de agua estéril y disgregada mediante el uso de un agitador vórtex. Diluciones apropiadas de esta suspensión fueron sembradas en placas de agar McConkey (Britania, Argentina) e incubadas 48 h a 37°C y a temperatura ambiente por 48 h adicionales. Luego, las placas fueron visualmente inspeccionadas para determinar el número de colonias que mostraban una zona de reversión o halo de crecimiento desde los bordes de la colonia (Figura R1-iii). La frecuencia de reversión del morfotipo SCV se determinó como el porcentaje de colonias SCV que exhibían signos claros de reversión sobre el total de colonias analizadas.

Obtención de cepas de *P. aeruginosa* marcadas con la proteína fluorescente verde (GFP).

El marcaje diferencial de las cepas de *P. aeruginosa* se realizó utilizando la proteína fluorescente verde (GFP) mediante ensayos de conjugación tetraparental. Para ello, la cepa de *P. aeruginosa* a marcar (receptora) se cultivó en 10 ml de caldo LB durante 7 h en condiciones estáticas a 41°C. Como cepa donora se utilizó la cepa de *E. coli* AKN67 [235], la cual alberga el plásmido pBK-miniTn7-gfp3, que posee la secuencia de la GFP contenida dentro de los sitios Tn7 R y L del transposón Tn7. Por otro lado, este plásmido codifica para los genes *mob*, necesarios para la transferencia del transposón con la GFP, y para un gen de resistencia a Sm, necesario para su selección. El transposón Tn7 reconoce una secuencia terminal del gen cromosomal de *P. aeruginosa* *glmS* y se inserta en la región intergénica que se localiza corriente abajo de dicho gen [241]. Como cepas “helper” se utilizaron las cepas de *E. coli* AKN68 [236] y *E. coli* pRK600 [242], las cuales poseen plásmidos que codifican para la transposasa y los genes *tra* necesarios igualmente para la transferencia. Con cada una de las cepas de *E. coli* se inocularon frascos conteniendo 10 ml de caldo LB suplementado con los antibióticos correspondientes, los cuales fueron incubados durante 4 h a 37°C en agitación constante. Pasados los tiempos de incubación, alícuotas de cada cultivo se mezclaron en una proporción 1:1:1 y un volumen de 100 μ l de la mezcla fue depositado en la superficie de una placa de LB agar. Luego de 24 h de incubación

en estufa a 37°C, las bacterias fueron resuspendidas y diluciones apropiadas fueron sembradas en placas de agar cetrimide (Britania, Argentina) suplementado con Sm 500 µg/ml. El cetrimide es un detergente catiónico antiséptico que actúa como agente inhibidor del crecimiento de bacterias a excepción de *P. aeruginosa*, por lo tanto, en este medio de cultivo, las cepas de *E. coli* son contra seleccionadas al mismo tiempo que la Sm permite seleccionar colonias de *P. aeruginosa* que hubieran adquirido el transposón por conjugación. La presencia de la marca de GFP fue confirmada por inspección visual de las colonias obtenidas utilizando un microscopio directo Axioplan (Zeiss, Alemania) equipado con un objetivo Plan CN 4X (Olympus, Japón) y un filtro de fluorescencia 31001 (Chroma Technology, USA). Asimismo, para confirmar la inserción del transposón se realizó una reacción de PCR de los clones de *P. aeruginosa* fluorescentes utilizando los oligonucleótidos PTn7R y PglmS-down (Tabla M2), los cuales amplifican un fragmento de 272 pb entre el transposón insertado y el gen flanqueando *glmS* [240].

Experimentos de competencia en cultivos en biofilms.

Con el objetivo de determinar la ventaja adaptativa (*fitness* relativo) de las distintas variantes de *P. aeruginosa* a analizar, se realizaron experimentos de competencia en biofilms. Para ello, se co-inocularon cultivos en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Austria) en una proporción inicial 1:1 de cada competidor diferencialmente marcados con la proteína GFP, de acuerdo a lo indicado en el punto anterior. Luego de 4 días de incubación, durante los cuales los medios de cultivos fueron renovados diariamente con 100 µl de caldo LB fresco, los biofilms fueron cosechados, disgregados y sembrados en placas de LB agar. Pasadas 24 h de incubación en estufa a 37°C, se determinó la proporción de cada competidor mediante el recuento del número de colonias. Particularmente, el número de colonias fluorescentes fue determinado utilizando un microscopio directo Axioplan (Zeiss, Alemania) equipado con un objetivo Plan CN 4X (Olympus, Japón) y un filtro de fluorescencia 31001 (Chroma Technology, USA). El valor de *fitness* relativo se expresó en términos del índice de Malthusian (*W*):

$$W = \frac{\ln \left[\frac{N_j(1)}{N_j(0)} \right]}{\ln \left[\frac{N_i(1)}{N_i(0)} \right]}$$

En la fórmula, N (0) y N (1) indican los números iniciales y finales de individuos totales, respectivamente y los sufijos j e i indican la proporción de cada competidor. En base a esto, valores mayores a 1 indican un *fitness* relativo mayor del competidor expresado en el numerador. El experimento fue realizado por cuadruplicado, de tal forma que en cada competidor llevó la marca de GFP en la mitad de las réplicas. Previo a los experimentos de competitividad, se confirmó que no existieran diferencias significativas en los tiempos de generación entre las distintas cepas evaluadas. De esta forma, se descartó la posibilidad de que los resultados obtenidos se debieran a diferencias en las tasas de crecimiento o causados por la transformación con los distintos plásmidos, o bien por la presencia del transposón *minitrn7::GFP*, utilizado para la marca diferencial en los experimentos de competencia.

Ensayos de complementación de la hipermutabilidad y determinación de la frecuencia de mutación.

Los ensayos de complementación de las cepas hipermutadoras deficientes en el gen *mutS* se llevó a cabo mediante la transformación de las mismas con el vector *p3::mutS*, el cual posee una copia funcional de este gen. Para la obtención del vector *p3::mutS*, el plásmido *pMCS-mutS* [243] fue digerido con las enzimas *ApaI/SpeI* para obtener un fragmento de ~2,6 Kb que contiene la copia del gen. Dicho fragmento fue purificado mediante el kit comercial *Silica Bead DNA Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA) y posteriormente ligado al plásmido *pBBR1MCS-3 (p3)* [182] previamente digerido con las mismas enzimas *ApaI/SpeI*. El vector *p3::mutS* obtenido fue propagado en cepas de *E. coli* DH5 α a través de su transformación mediante shock térmico según protocolos estándares [244]. Posteriormente, células competentes de *P. aeruginosa* normomutadoras e hipermutadoras fueron transformadas con el vector *p3* vacío o bien con la construcción *p3::mutS* mediante electroporación según protocolos previamente

descriptos [245]. Las células transformadas fueron seleccionadas en placas de LB agar conteniendo Tc 30 µg/ml.

La frecuencia de mutación de las cepas que contenían el vector p3 o su derivado p3::mutS fue determinada mediante la cuantificación del número de colonias resistentes a Sm [150]. Brevemente, se inocularon frascos conteniendo 10 ml de caldo LB conteniendo Tc 30 g/ml (LB-Tc) durante 24 h a 37°C con en agitación constante. Se realizaron diluciones apropiadas de cada cultivo y se sembraron placas de agar LB-Tc para determinar el número de células totales. Paralelamente, se sembraron placas de agar LB-Tc suplementado con Sm 500 µg/ml para contabilizar el número de células resistentes a este antibiótico surgidas espontáneamente. La frecuencia de mutación se expresó como el número de colonias resistentes a Sm cada 10^8 células.

Experimento de evolución *in vitro*: conversión y reversión al fenotipo SCV.

Con el objetivo de evaluar la flexibilidad genética de las cepas de *P. aeruginosa* normomutadoras e hipermutadoras en la conversión y reversión al fenotipo SCV, se diseñó un modelo de evolución experimental *in vitro*, el cual incluyó ciclos sucesivos de conversión en cultivos en biofilms, seguidos de ciclos de reversión en placas de agar McConkey. Los cultivos en biofilms fueron realizados de acuerdo con el protocolo utilizado para la determinación de la diversificación fenotípica, descrita en la sección anterior. A partir de los cultivos en biofilms cosechados, disgregados y sembrados en cada ciclo, se seleccionaron 3 colonias SCV al azar, las cuales fueron conservadas a -80°C en stocks de glicerol al 15%. Los biofilms disgregados en cada ciclo fueron igualmente conservados a -80°C en stocks de leche descremada al 10%. De los 3 clones SCV seleccionados, sólo uno de ellos fue al azar fue utilizado como el fundador de los ciclos de reversión subsiguientes.

El clon SCV elegido fue disgregado en 100 µl de agua estéril formando una suspensión que fue utilizada para sembrar placas de agar McConkey e incubadas, de acuerdo al protocolo de reversión descrito en la sección anterior. De aquellas colonias que mostraron signos claros de reversión, 3 de ellas fueron seleccionadas para el aislamiento de células revertidas en placa de LB agar. Clones únicos de

estos aislamientos fueron posteriormente conservados a -80°C en stocks de glicerol al 15%. Sólo uno de los clones revertidos fue elegido al azar y utilizado para fundar un nuevo ciclo de conversión.

Este procedimiento fue llevado a cabo para constituir a partir de las cepas de *P. aeruginosa* UCBPP_PA14 WT y su isogénica *mutS*, 5 y 4 líneas evolutivas paralelas, respectivamente.

Secuenciamiento de genomas completos de *P. aeruginosa*

Con el objeto de indagar en las bases moleculares involucradas en la adaptación al modelo evolutivo diseñado, se procedió al secuenciamiento de los genomas completos de *P. aeruginosa* ancestrales y evolucionados. El secuenciamiento se llevó a cabo mediante la plataforma Illumina Hi-Seq 1500 (INDEAR-Argentina), Hi-Seq 2000 (BGI, Hong-Kong) o Next-Seq 500 (Inst. PASTEUR-Francia), las cuales permitieron que el genoma total de *P. aeruginosa*, que comprende 6 Mpb, esté representado en las lecturas obtenidas. Los clones seleccionados para el secuenciamiento y la tecnología empleada para cada cepa se detallan en la Tabla M3.

Para el secuenciamiento, se procedió a la extracción de ADN genómico de los clones seleccionados empleando el kit de purificación Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, USA). Las muestras de ADN genómico así purificadas fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa para confirmar su pureza, cantidad e integridad. Las distintas muestras fueron enviadas a los servicios brindados por INDEAR (Argentina) o bien a los laboratorios de la Dra. Carla Saleh en el Instituto Pasteur de París (Francia) y al Dr. Søren Molin en la Universidad Técnica de Dinamarca, en donde se procedió a la construcción de las librerías y secuenciamientos correspondiente.

Tabla M3. Clones de *P. aeruginosa* seleccionados para el secuenciamiento de genomas completos mediante la plataforma Illumina.

Clon	Genotipo, características relevantes	Plataforma de secuenciamiento ¹
WT0	<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 WT0, ancestro normomutador	Hi-seq 2000
WT1R4	Variante revertida final obtenida en el ciclo 4 en la línea 1	Hi-seq 1500
WT2R6	Variante revertida final obtenida en el ciclo 6 en la línea 2	Next-Seq 500
WT3R10	Variante revertida final obtenida en el ciclo 10 en la línea 3	Hi-seq 1500
WT4R4	Variante revertida final obtenida en el ciclo 4 en la línea 4	Next-Seq 500
WT5R4	Variante revertida final obtenida en el ciclo 4 en la línea 5	Hi-seq 1500
mutS0	<i>P. aeruginosa</i> UCBPP-PA14 mutS0, ancestro hipermutador	Hi-seq 2000
mutS1R3	Variante SCV obtenida en el ciclo 3 en la línea 1	Hi-seq 1500
mutS1R9	Variante SCV obtenida en el ciclo 9 en la línea 1	Next-Seq 500
mutS1R13	Variante SCV obtenida en el ciclo 13 en la línea 1	Next-Seq 500
mutS1R15	Variante SCV obtenida en el ciclo 15 en la línea 1	Next-Seq 500
mutS2R3	Variante SCV obtenida en el ciclo 3 en la línea 2	Hi-seq 1500
mutS2R5	Variante SCV obtenida en el ciclo 5 en la línea 2	Next-Seq 500
mutS2R11	Variante SCV obtenida en el ciclo 11 en la línea 2	Next-Seq 500
mutS2R15	Variante SCV obtenida en el ciclo 15 en la línea 2	Next-Seq 500
mutS3R3	Variante SCV obtenida en el ciclo 3 en la línea 3	Hi-seq 1500
mutS3R15	Variante SCV obtenida en el ciclo 15 en la línea 3	Next-Seq 500
mutS4R3	Variante SCV obtenida en el ciclo 3 en la línea 4	Hi-seq 1500

¹ Las plataformas de secuenciamiento utilizadas fueron de tecnología Illumina Hi-seq 1200 (GBI, Hong Kong), Hi-seq 1500 (INDEAR, Argentina) o Next-Seq 500 (Instituto Pasteur de París).

Análisis de secuencias genómicas, detección y caracterización de mutaciones

Con el propósito de determinar variaciones genéticas ocurridas entre los clones evolucionados con respecto a sus ancestros, se llevaron a cabo análisis de genómica estructural y comparativa. Para ello y en primera instancia, la secuencia de los adaptadores y las lecturas duplicadas fueron eliminadas y a través del programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) se evaluó la calidad de las lecturas obtenidas durante el secuenciamiento masivo.

La estrategia bioinformática que se empleó para la determinación de la ocurrencia de mutaciones se basó en el alineamiento entre las lecturas obtenidas y el genoma de la cepa UCBPP-PA14, el cual se encuentra secuenciado completamente y disponible [52]. Para tal fin se empleó el algoritmo BWA-MEM correspondiente al software BWA [246]. Los archivos generados conteniendo el mapeo de las lecturas (*pileups*) fueron analizados mediante dos metodologías: i) el

paquete bioinformático SAMtools release 1.3.1 [247] y ii) las herramientas GATK (Genome Analysis Toolkit [248]). Utilizando SAMtools, se analizaron los archivos mediante el comando `samtools mpileup` que permite descartar las lecturas que contienen apareamientos erróneos excesivos (*mismatches*) utilizando el parámetro `-C50`. Así, se retuvieron las lecturas que tuvieran un valor de 20 en la calidad de mapeo (`-q20`), lo que se traduce en una probabilidad del 99% de que una lectura esté bien alineada. Por último, se retuvieron los SNPs inequívocos que tuvieran un valor de 20 en la calidad de base (`-Q20`) lo cual significa una precisión del 99% en la identificación de los nucleótidos. La determinación de las mutaciones se realizó mediante el programa BCFtools con el comando `bcftools call -c`, empleando parámetros predeterminados. Por su lado, utilizando GATK, el archivo *pileup* fue procesado mediante el algoritmo HaplotypeCaller bajo los parámetros predeterminados del programa. HaplotypeCaller es un programa muy completo que determina la presencia de una posible mutación o haplotipo, realinea las lecturas a sus haplotipos más probables y posteriormente proyecta estas lecturas en la secuencia de referencia. Finalmente, se filtraron los SNPs, descartando aquellos que tuvieran un valor menor a 20 en la calidad de base (`min_base_quality_score 20`), lo cual significa una precisión del 99% en la identificación de los nucleótidos.

Con las dos metodologías anteriormente descritas, SAMtools y GATK, se obtuvieron archivos con una extensión VCF (Variant Calling Format), los cuales comprenden una lista de las mutaciones del genoma analizado y sus posiciones con respecto al genoma de referencia. Cada una de las mutaciones fue anotada utilizando el programa SNPeff [184].

Los efectos de las mutaciones fueron predichos mediante los programas SNPeff [249] y SIFT [185]. SNPeff, además de la anotación de las mutaciones, analiza la consecuencia directa de las mutaciones sobre la expresión de los genes e informa el resultado como el efecto observado (bajo, moderado y alto). Por su lado, el algoritmo SIFT realiza una predicción más profunda en base al efecto de una mutación en la función de la proteína, analizando únicamente mutaciones génicas con cambio de sentido, mientras que las mutaciones de tipo inserciones/deleciones o de ganancia/pérdida de un codón de terminación

quedan sin poder ser analizados. De esta manera, SIFT predice si la sustitución de un aminoácido particular tiene la capacidad de afectar la función de una proteína específica en base al grado de conservación de residuos aminoacídicos. Para ello, realiza alineamientos de secuencias múltiples a partir de secuencias estrechamente relacionadas colectadas a través de PSI-BLAST. De esta manera, se predice si la sustitución originada por la mutación afecta la función de la proteína o podría ser tolerada.

Por último, de las listas de mutaciones obtenidas para cada clon evolucionado con respecto a la referencia UCBPP-PA14, se restaron las variaciones observadas en la cepa ancestral correspondiente, de manera que sólo se tuvieron en consideración las mutaciones acumuladas en el transcurso del proceso evolutivo impuesto.

Confirmación de la presencia de mutaciones mediante amplificación por PCR y secuenciamiento directo.

Una vez realizado el análisis bioinformático, se llevó a cabo la confirmación de la presencia de mutaciones mediante PCR y secuenciamiento directo de los fragmentos de ADN que contenían la mutación. Para ello, se utilizó como templado ADN genómico obtenido a partir de las cepas ancestrales WT0 y *mutS0* y de los distintos clones evolucionados. La amplificación por PCR de cada fragmento específico fue llevada a cabo de acuerdo a lo detallado en la sección correspondiente anterior. Posteriormente, los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit Silica Bead DNA Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific, USA) y sometidos a secuenciamiento automático directo de ADN (UCCCC DNA Sequencing Facility, Universidad de Chicago, USA). Para confirmar la presencia de las mutaciones en los fragmentos secuenciados, las mismas se analizaron comparativamente respecto a las secuencias genómicas obtenidas a partir de los clones correspondientes así como de las cepas ancestrales mediante el programa SeqMan II (DNASTAR, Inc; USA).

Sobreexpresión de la fosfodiesterasa (FDE) PA2133 en clones SCV.

Para la sobreexpresión de la FDE PA2133 se utilizó el plásmido pJN2133 [199], el cual lleva clonado en los sitios EcoRI/XbaI el gen PA2133, el cual codifica para una FDE de la cepa *P. aeruginosa* PAO1. Este plásmido deriva del pJN105 [200], el cual posee el promotor araBAD, inducible por arabinosa, que permite controlar los niveles de expresión del gen clonado. El vector pJN2133 fue amablemente brindado por la Dra. Caroline Harwood de la Universidad de Washington, USA, mientras que el pJN105 fue gentilmente provisto por el Dr. Edgardo Jofré de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Con 1 µl de una preparación de los plásmidos pJN105 y pJN2133 se transformaron por electroporación las variantes SCV normomutadoras seleccionadas utilizando protocolos estándares [245]. Las variantes transformadas fueron posteriormente seleccionadas en placas de agar LB conteniendo Gm 40 µg/ml.

En el caso particular de los clones hipermutadores se utilizaron los plásmidos pJN105Tc y pJN2133Tc, los cuales derivan del pJN105 y pJN2133 respectivamente, los cuales fueron modificados mediante el clonado de un cassette de resistencia a Tc. Para su construcción, el gen de resistencia a Tc fue amplificado por PCR a partir del plásmido p3 [182], utilizando los oligonucleótidos Tc-NcoI For y Tc-ApaI Rev (Tabla M2). El fragmento de 1,5 Kb, que contiene al gen de resistencia a Tc se digirió con las enzimas NcoI y ApaI y posteriormente se purificó mediante el kit comercial Silica Bead DNA Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific, USA). Este fragmento fue seguidamente ligado al plásmido pJN105 y al pJN2133, previamente digeridos con las enzimas NcoI/ApaI. La construcción así obtenida fue propagada en cepas de *E. coli* DH5α, las cuales fueron seleccionadas en placas de LB agar conteniendo Tc 20 µg/ml. Estos plásmidos se utilizaron para transformar por electroporación a los clones de *P. aeruginosa* SCV pertenecientes a las líneas hipermutadoras. Las variantes transformadas fueron seleccionadas en placas de LB agar conteniendo Tc 30 µg/ml.

Para realizar los ensayos de sobreexpresión de la FDE PA2133, las variantes con morfología SCV transformadas con los plásmidos indicados fueron crecidas ON en medios de cultivos líquidos suplementados con Gm 40 µg/ml (normomutadoras) o Tc 30 µg/ml (hipermutadoras) a 37°C con agitación

constante. Posteriormente, diluciones apropiadas de estos cultivos fueron sembradas en placas de LB agar conteniendo arabinosa 0.2% p/v e incubadas durante 24 h a 37°C. La morfología de las colonias fue inspeccionada visualmente y las mismas fueron fotografiadas mediante la utilización de un microscopio directo Axioplan (Zeiss, Alemania) equipado con un objetivo Plan CN 4X (Olympus, Japón) y una cámara digital AxioCam (Zeiss, Alemania).

Sobreexpresión de la diguanilato ciclasa (DGC) *wspR* en clones revertidos.

Para llevar a cabo los ensayos de sobreexpresión de la DGC *wspR*, se construyó el plásmido pJN*wspR* a partir del plásmido pJN2133 [199]. Con este propósito, se amplificó el gen PA14_16500 (*wspR*), utilizando los oligonucleótidos específicos *wspR*-EcoRI For y *wspR*-XbaI Rev. El fragmento obtenido fue purificado y ligado al fragmento de 6 Kb previamente obtenido por digestión del plásmido pJN2133 con las enzimas EcoRI/XbaI, las cuales permiten liberar el gen PA2133. La mezcla de ligado fue utilizada para transformar cepas de *E. coli* DH5 α , y los ligados recuperados por selección con Gm 10 μ g/ml.

Las distintas variantes de *P. aeruginosa* con morfología revertida fueron transformadas con los plásmidos pJN*wspR* y pJN105 y diluciones apropiadas obtenidas a partir de cultivos ON fueron sembradas en placas de LB agar suplementado con Gm 40 μ g/ml y arabinosa 0.5% P/V. Las placas fueron incubadas en estufa a 37° durante 24 h y finalmente la morfología obtenida fue determinada y fotografiada mediante inspección visual utilizando un microscopio directo Axioplan (Zeiss, Alemania) equipado con un objetivo Plan CN 4X (Olympus, Japón) y una cámara digital AxioCam (Zeiss, Alemania).

Determinación de los niveles de c-di-GMP mediante nano-HPLC acoplado a espectrometría de masa

Para la determinación de la concentración de c-di-GMP se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta performance nano-HPLC acoplada a un espectrómetro de masa [250], en colaboración con el grupo de la Dra. Rosario Durán del Instituto Pasteur de Montevideo (Uruguay).

Para la obtención de los extractos, se utilizaron 2 ml de cultivos ON obtenidos a partir de cada clon. Para evitar la degradación enzimática del c-di-GMP se adicionaron los inhibidores de proteasas cOmplete™ y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Sigma-Aldrich, USA). Posteriormente, se procedió a la extracción del compuesto procediendo de la siguiente manera: los cultivos fueron centrifugados a 5000 g durante 15 min; se descartaron los sobrenadantes, se determinó el peso del precipitado y se agregó agua deionizada para resuspender las células. Esta suspensión se calentó a 95°C durante 10 min. Seguidamente, se agregó etanol al 99% y los tubos fueron centrifugados nuevamente a la misma velocidad. Se recolectó el sobrenadante en un tubo nuevo y el precipitado fue sometido a un nuevo proceso de extracción. Finalmente, los sobrenadantes fueron combinados y se congelaron a -80°C para su liofilización.

A continuación, las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en 500 µl de agua deionizada y una alícuota de 100 µl fue analizada utilizando el equipo nanoHPLC Proxeon easynLC (Thermo Fisher Scientific, USA) equipado con una columna de fase reversa C18 (Hypersil Gold aQ, 3 µm, 150 × 4.6 mm, Thermo Fisher Scientific, USA). Los solventes utilizados fueron: ácido trifluoroacético 0.1% en agua (fase A) y ácido trifluoroacético 0.1% en metanol (fase B) a un flujo constante de 1 ml/min. Las mediciones fueron realizadas a 254 y 280 nm. Para eluir el c-di-GMP se utilizó el siguiente gradiente expresado en % de volumen de la fase B: de 0 a 2 min, 1% de fase B (que corresponde a una mezcla 1% de fase B y 99% de fase A); de 2 a 22 min, 20% de fase B; de 22 a 30 min, 100% de fase B y de 30 a 32 min, nuevamente 1% de fase B. Este gradiente resultó en una elución del c-di-GMP en aproximadamente 9.85 min. Los picos correspondientes a este tiempo de retención fueron recolectados para su posterior análisis por espectrometría de masa. El área bajo la curva de cada pico fue determinada y el c-di-GMP cuantificado con respecto a una curva de calibración realizada previamente utilizando concentraciones testigos de c-di-GMP (Bis-(3'-5')-cyclic diguanylic monophosphate c-di-GMP; Biolog, Alemania). La concentración de c-di-GMP obtenido se expresó como nanomoles de c-di-GMP relativo al peso seco de los cultivos iniciales.

La identificación del c-di-GMP por espectrometría de masa se realizó con el equipo LTQ Velos nano-ESI-linear Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA) y el programa Data Explorer™ Software (Applied Biosystems, USA). El análisis permitió confirmar que el pico obtenido bajo estas condiciones experimentales en el tiempo de retención cercano a 9.85 min correspondió al c-di-GMP.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) a ciprofloxacina.

Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima al antibiótico ciprofloxacina, se realizaron diluciones de turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de McFarland en caldo Mueller-Hinton (Britania, Argentina) a partir de cultivos saturados. 2 µl de esta suspensión fueron utilizados para inocular placas de agar Mueller-Hinton suplementado con ciprofloxacina en las concentraciones comprendidas entre 0,05 y 4 µg/ml. La CIM fue determinada como la mínima concentración de ciprofloxacina que impidió el desarrollo visible de bacterias. Cada determinación se realizó por triplicado y la cepa *E. coli* ATCC 25922 fue utilizada como control. La interpretación de los valores de CIM obtenidos fue realizada de acuerdo a las normas “*Clinical & Laboratory Standards Institute*” (CLSI) [251].

Análisis Estadísticos

Para comparar las propiedades fenotípica de clones de *P. aeruginosa* se utilizaron las pruebas t de Student o t-test así como One way ANOVA y posteriormente el test Tukey. Para los ensayos de competencia, las diferencias entre la media teórica 1 y los valores de *fitness* relativo se evaluaron mediante t-test. Estas pruebas y sus respectivos gráficos fueron realizados a través del programa GraphPad Prism (versión 5.03). Para todos los casos, las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de probabilidad P fuera menor a 0.05.

Para comparar el número de mutaciones esperada (N_e) por azar en genes con dominios DGC y FD respecto al número observado (N_o) en el modelo de evolución *in vitro*, se realizó una prueba Chi-cuadrado ($P < 0.05$) [217]. A su vez, N_e

fue estimado mediante la multiplicación entre el número total de mutaciones acumuladas (N) y la proporción que representan los genes con dominios DGC y FDE (P). El total de mutaciones acumuladas (N) fue igual a 27 en el caso de las cepas normomutadoras (Tabla R3) e igual a 951 para el caso de hipermutadoras (Tabla R4), los cuales corresponden a la suma de las mutaciones observadas en los genomas de las cepas más evolucionadas. Por su lado, el valor de P se obtuvo dividiendo el número de genes con dominios DGC o FDE (valor igual a 40) sobre el número total de genes codificantes de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 [52] (valor igual a 5892 genes). El número de mutaciones observado (No) correspondió al número de genes mutados con dominios DGC o FDE, exclusivamente. Para el caso de cepas normomutadoras, este valor fue de 15 mientras que para el caso de las hipermutadoras el valor observado fue de 14. La prueba estadística fue realizada mediante el software GraphPad Prism (versión 5.03).

El modelo estadístico lineal de efectos mixtos se llevó a cabo mediante la librería lme4 de R Bioconductor. Para ello y primeramente, los valores de frecuencia de conversión SCV correspondientes a los ciclos 1, 3 y 5 de evolución obtenidos a partir de cada línea evolutiva normo e hipermutadora fueron expresados en términos de proporciones y posteriormente transformados utilizando el comando arcosine, obteniéndose como resultado el arcocoseno de la raíz cuadrada de estas proporciones. Luego, la variable dependiente (proporción de SCV) se modeló en función de tres términos: la variable cepa en sus dos niveles (WT/mutS), la variable ciclo evolutivo en sus tres niveles (ciclos 1, 3 y 5) y la interacción que pudiera existir entre ambas (expresado como “cepa x ciclo”). Además, se consideró un efecto aleatorio asociado a cada línea evolutiva (expresado como “1|línea”), el cual indica que las proporciones observadas en una misma línea en los sucesivos ciclos están relacionadas entre sí. El modelo así planteado ($\text{proporción de SCV} \sim \text{cepa} + \text{ciclo} + \text{cepa} \times \text{ciclo} + 1|\text{línea}$), fue analizado con respecto a modelos simplificados en donde alguno de los términos anteriormente descrito es eliminado de manera progresiva, de forma tal que su relevancia estadística es evaluada a través del test de cociente de probabilidad (*likelihood ratios test*), el cual asume una distribución chi-cuadrado y es realizado a través de ANOVA. El valor de $P < 0.05$ indica su relevancia en el modelo ajustado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Capra EJ, Laub MT (2012) The Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annual review of microbiology* 66: 325-347.
2. Galhardo RS, Hastings PJ, Rosenberg SM (2007) Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 399-435.
3. Kimura M (1991) The neutral theory of molecular evolution: a review of recent evidence. *Jpn J Genet* 66: 367-386.
4. Luria SE, Delbruck M (1943) Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* 28: 491-511.
5. Cox EC, Gibson TC (1974) Selection for High Mutation Rates in Chemostats. *Genetics* 77: 169-184.
6. Taddei F, Matic I, Godelle B, Radman M (1997) To be a mutator, or how pathogenic and commensal bacteria can evolve rapidly. *Trends Microbiol* 5: 427-428; discussion 428-429.
7. Giraud A, Matic I, Tenailon O, Clara A, Radman M, et al. (2001) Costs and Benefits of High Mutation Rates: Adaptive Evolution of Bacteria in the Mouse Gut. *Science* 291: 2606-2608.
8. Taddei F, Radman M, Maynard-Smith J, Toupance B, Gouyon PH, et al. (1997) Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* 387: 700-702.
9. Drake JW (1991) A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 7160-7164.
10. Kimura M (1967) On the evolutionary adjustment of spontaneous mutation rates. *Genetical Research* 9: 23-34.
11. Miller JH (1996) Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annu Rev Microbiol* 50: 625-643.
12. Delbr, xfc, ck M (1945) Spontaneous Mutations of Bacteria. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 32: 223-233.
13. LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA (1996) High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* 274: 1208-1211.
14. Matic I, Radman M, Taddei F, Picard B, Doit C, et al. (1997) Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. *Science* 277: 1833-1834.
15. Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen HE, Hoiby N (2005) Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2276-2282.
16. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288: 1251-1254.
17. Feliziani S, Marvig RL, Luján AM, Moyano AJ, Di Rienzo JA, et al. (2014) Coexistence and Within-Host Evolution of Diversified Lineages of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Long-term Cystic Fibrosis Infections. *PLoS Genetics* 10: e1004651.
18. Martina P, Feliziani S, Juan C, Bettiol M, Gatti B, et al. (2014) Hypermutation in *Burkholderia cepacia* complex is mediated by DNA mismatch repair inactivation and is highly prevalent in cystic fibrosis chronic respiratory infection. *Int J Med Microbiol* 304: 1182-1191.

19. Prunier AL, Malbruny B, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, et al. (2003) High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis* 187: 1709-1716.
20. Galán JC, Baquero MR, Morosini MI, Baquero F (2006) Bacterias con alta tasa de mutación: los riesgos de una vida acelerada. *Infectio* 10: 22-29.
21. Björkholm B, Sjölund M, Falk PG, Berg OG, Engstrand L, et al. (2001) Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 14607-14612.
22. Watson ME, Jr., Burns JL, Smith AL (2004) Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology* 150: 2947-2958.
23. Tenaillon O, Taddei F, Radmian M, Matic I (2001) Second-order selection in bacterial evolution: selection acting on mutation and recombination rates in the course of adaptation. *Res Microbiol* 152: 11-16.
24. Streeter K, Katouli M (2016) *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. *Infection, Epidemiology and Medicine* 2: 25-32.
25. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35: 652-680.
26. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L (1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 5: 279-313.
27. de Bentzmann S, Plesiat P (2011) The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environ Microbiol* 13: 1655-1665.
28. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2: 1051-1060.
29. Nicolle LE (2014) Catheter associated urinary tract infections. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 3: 23-23.
30. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 67: 351-368.
31. Strateva T, Mitov I (2011) Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of Microbiology* 61: 717-732.
32. Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG, et al. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268.
33. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, et al. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection: Importance of Appropriate Initial Antimicrobial Treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 1306-1311.
34. Al-Hasan MN, Wilson JW, Lahr BD, Eckel-Passow JE, Baddour LM (2008) Incidence of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: a population-based study. *Am J Med* 121: 702-708.
35. Saint S, Chenoweth CE (2003) Biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Infect Dis Clin North Am* 17: 411-432.

36. Branski LK, Al-Mousawi A, Rivero H, Jeschke MG, Sanford AP, et al. (2009) Emerging infections in burns. *Surg Infect (Larchmt)* 10: 389-397.
37. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R (2006) Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev* 19: 403-434.
38. Ratnam S, Hogan K, March SB, Butler RW (1986) Whirlpool-associated folliculitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*: report of an outbreak and review. *Journal of Clinical Microbiology* 23: 655-659.
39. Tate D, Mawer S, Newton A (2003) Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* folliculitis associated with a swimming pool inflatable. *Epidemiology and Infection* 130: 187-192.
40. Gençer S, Özer S, Ege Gül A, Doğan M, Ak Ö (2008) Ecthyma gangrenosum without bacteremia in a previously healthy man: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 2: 14-14.
41. Chan YH, Chong CY, Puthuchery J, Loh TF (2006) Ecthyma gangrenosum: a manifestation of *Pseudomonas sepsis* in three paediatric patients. *Singapore Med J* 47: 1080-1083.
42. Sizmaz S, Bingollu S, Erdem E, Kibar F, Koltas S, et al. (2016) Polymicrobial Infection of the Cornea Due to Contact Lens Wear. *Turk J Ophthalmol* 46: 83-86.
43. Sy A, Srinivasan M, Mascarenhas J, Lalitha P, Rajaraman R, et al. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* keratitis: outcomes and response to corticosteroid treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53: 267-272.
44. Morales E, Cots F, Sala M, Comas M, Belvis F, et al. (2012) Hospital costs of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *BMC Health Serv Res* 12.
45. Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R (2005) Nosocomial infections due to multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy* 25: 1353-1364.
46. Restrepo MI, Anzueto A (2009) The role of gram-negative bacteria in healthcare-associated pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 30: 61-66.
47. Gomez MI, Prince A (2007) Opportunistic infections in lung disease: *Pseudomonas* infections in cystic fibrosis. *Curr Opin Pharmacol* 7: 244-251.
48. Klepac-Ceraj V, Lemon KP, Martin TR, Allgaier M, Kembel SW, et al. (2010) Relationship between cystic fibrosis respiratory tract bacterial communities and age, genotype, antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 12: 1293-1303.
49. Harrison F (2007) Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 153: 917-923.
50. Romling U, Fiedler B, Bosshammer J, Grothues D, Greipel J, et al. (1994) Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Infect Dis* 170: 1616-1621.
51. Doring D (1993) Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients. *Pseudomonas aeruginosa as an opportunistic pathogen*. New York: Plenum Press.

52. Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, et al. (2006) Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biology* 7: R90.
53. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, et al. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.
54. Ernst RK, D'Argenio DA, Ichikawa JK, Bangera MG, Selgrade S, et al. (2003) Genome mosaicism is conserved but not unique in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the airways of young children with cystic fibrosis. *Environ Microbiol* 5: 1341-1349.
55. Kresse AU, Dinesh SD, Larbig K, Romling U (2003) Impact of large chromosomal inversions on the adaptation and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically colonizing cystic fibrosis lungs. *Mol Microbiol* 47: 145-158.
56. Klockgether J, Munder A, Neugebauer J, Davenport CF, Stanke F, et al. (2010) Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J Bacteriol* 192: 1113-1121.
57. Kreda SM, Davis CW, Rose MC (2012) CFTR, mucins, and mucus obstruction in cystic fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a009589.
58. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066-1073.
59. Knowlton RG, Cohen-Haguenauer O, Van Cong N, Frezal J, Brown VA, et al. (1985) A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7. *Nature* 318: 380-382.
60. Kerem BS, Buchanan JA, Durie P, Corey ML, Levison H, et al. (1989) DNA marker haplotype association with pancreatic sufficiency in cystic fibrosis. *Am J Hum Genet* 44: 827-834.
61. Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman J-J (2002) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *Journal of Cystic Fibrosis* 1: 13-29.
62. Rosenstein BJ, Cutting GR (1998) The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *The Journal of Pediatrics* 132: 589-595.
63. Sant'Agnese PAD, Grossman H, Darling RC, Denning CR (1958) SALIVA, TEARS AND DUODENAL CONTENTS IN CYSTIC FIBROSIS OF THE PANCREAS. *Pediatrics* 22: 507-514.
64. Kaplan E, Shwachman H, Perlmutter AD, Rule A, Khaw K-T, et al. (1968) Reproductive Failure in Males with Cystic Fibrosis. *New England Journal of Medicine* 279: 65-69.
65. Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, et al. (1995) Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 151: 1075-1082.
66. Fahy JV, Dickey BF (2010) Airway Mucus Function and Dysfunction. *The New England journal of medicine* 363: 2233-2247.
67. Moskowitz SM, Chmiel JF, Stern DL, Cheng E, Gibson RL, et al. (2008) Clinical practice and genetic counseling for cystic fibrosis and CFTR-related disorders. *Genet Med* 10: 851-868.

68. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB (2002) Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 194-222.
69. Roman F, Canton R, Perez-Vazquez M, Baquero F, Campos J (2004) Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J Clin Microbiol* 42: 1450-1459.
70. Cardines R, Giufre M, Pompilio A, Fiscarelli E, Ricciotti G, et al. (2012) *Haemophilus influenzae* in children with cystic fibrosis: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, distribution of adhesins and biofilm formation. *Int J Med Microbiol* 302: 45-52.
71. LiPuma JJ (2010) The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* 23: 299-323.
72. Harris JK, De Groot MA, Sagel SD, Zemanick ET, Kapsner R, et al. (2007) Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 20529-20533.
73. de Vrankrijker AM, van der Ent CK, van Berkhout FT, Stellato RK, Willems RJ, et al. (2011) *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clin Microbiol Infect* 17: 1381-1386.
74. Martina P, Mazur, F, Cazzola, L, Prieto, C, Perez, S, Quiroga, M, Yantorno, O, Valdez, E, & Bosch, A (2016) Diversidad genética y resistencia antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de pacientes fibroquísticos adultos de Argentina. *Revista de Ciencia y Tecnología* 25: 4-10.
75. Cigana C, Lorè NI, Bernardini ML, Bragonzi A (2011) Dampening Host Sensing and Avoiding Recognition in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011: 852513.
76. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, et al. (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8487-8492.
77. Rau MH, Hansen SK, Johansen HK, Thomsen LE, Workman CT, et al. (2010) Early adaptive developments of *Pseudomonas aeruginosa* after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. *Environ Microbiol* 12: 1643-1658.
78. Winstanley C, O'Brien S, Brockhurst MA (2016) *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends in Microbiology* 24: 327-337.
79. Nguyen D, Singh PK (2006) Evolving stealth: Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 8305-8306.
80. Feliziani S, Luján AM, Moyano AJ, Sola C, Bocco JL, et al. (2010) Mucoïdy, Quorum Sensing, Mismatch Repair and Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from Cystic Fibrosis Chronic Airways Infections. *PLoS ONE* 5: e12669.
81. Sousa AM, Pereira MO (2014) *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs—A Review. *Pathogens* 3: 680-703.

82. Marvig RL, Sommer LM, Molin S, Johansen HK (2015) Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat Genet* 47: 57-64.
83. Revdiwala S, Rajdev BM, Mulla S (2012) Characterization of Bacterial Etiologic Agents of Biofilm Formation in Medical Devices in Critical Care Setup. *Critical Care Research and Practice* 2012: 945805.
84. Moreau-Marquis S, Stanton BA, O'Toole GA (2008) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm Pharmacol Ther* 21: 595-599.
85. Wagner VE, Iglewski BH (2008) *P. aeruginosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol* 35: 124-134.
86. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, et al. (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 48: 1511-1524.
87. Tolker-Nielsen T, Brinch UC, Ragas PC, Andersen JB, Jacobsen CS, et al. (2000) Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J Bacteriol* 182: 6482-6489.
88. Vallet I, Diggle SP, Stacey RE, Cámara M, Ventre I, et al. (2004) Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*: Fimbrial cup Gene Clusters Are Controlled by the Transcriptional Regulator MvaT. *Journal of Bacteriology* 186: 2880-2890.
89. Petrova OE, Sauer K (2012) Sticky Situations: Key Components That Control Bacterial Surface Attachment. *Journal of Bacteriology* 194: 2413-2425.
90. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184: 1140-1154.
91. Mann EE, Wozniak DJ (2012) *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. *FEMS microbiology reviews* 36: 893-916.
92. Wei Q, Ma LZ (2013) Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 20983-21005.
93. Kuchma SL, Connolly JP, O'Toole GA (2005) A three-component regulatory system regulates biofilm maturation and type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187: 1441-1454.
94. Southey-Pillig CJ, Davies DG, Sauer K (2005) Characterization of Temporal Protein Production in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Journal of Bacteriology* 187: 8114-8126.
95. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA (2003) Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 185: 1027-1036.
96. Lee B, Haagensen JAJ, Ciofu O, Andersen JB, Høiby N, et al. (2005) Heterogeneity of Biofilms Formed by Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 5247-5255.
97. Morgan R, Kohn S, Hwang SH, Hassett DJ, Sauer K (2006) BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188: 7335-7343.
98. Kim SK, Lee JH (2016) Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol* 54: 71-85.

99. Li Y, Heine S, Entian M, Sauer K, Frankenberg-Dinkel N (2013) NO-Induced Biofilm Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* Is Mediated by an MHYT Domain-Coupled Phosphodiesterase. *Journal of Bacteriology* 195: 3531-3542.
100. Chua SL, Liu Y, Yam JK, Chen Y, Vejborg RM, et al. (2014) Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. *Nat Commun* 5: 4462.
101. Kaplan JB (2010) Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research* 89: 205-218.
102. Woo JK, Webb JS, Kirov SM, Kjelleberg S, Rice SA (2012) Biofilm dispersal cells of a cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolate exhibit variability in functional traits likely to contribute to persistent infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 66: 251-264.
103. Kirov SM, Webb JS, O'May C Y, Reid DW, Woo JK, et al. (2007) Biofilm differentiation and dispersal in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* 153: 3264-3274.
104. Boles BR, Thoendel M, Singh PK (2004) Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 16630-16635.
105. McDaniel CT, Panmanee W, Hassett DJ (2015) An Overview of Infections in Cystic Fibrosis Airways and the Role of Environmental Conditions on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation and Viability. *Cystic Fibrosis in the Light of New Research*. Rijeka: InTech. pp. Ch. 0.
106. Stewart PS, Costerton JW (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358: 135-138.
107. Carmeli Y, Troillet N, Karchmer AW, Samore MH (1999) Health and economic outcomes of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Intern Med* 159.
108. Davies D (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2: 114-122.
109. Aaron SD, Ramotar K, Ferris W, Vandemheen K, Saginur R, et al. (2004) Adult cystic fibrosis exacerbations and new strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 811-815.
110. VanDevanter DR, Van Dalfsen JM (2005) How much do *Pseudomonas* biofilms contribute to symptoms of pulmonary exacerbation in cystic fibrosis? *Pediatr Pulmonol* 39: 504-506.
111. Hoiby N, Krogh Johansen H, Moser C, Song Z, Ciofu O, et al. (2001) *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect* 3: 23-35.
112. Huse HK, Kwon T, Zlosnik JE, Speert DP, Marcotte EM, et al. (2010) Parallel evolution in *Pseudomonas aeruginosa* over 39,000 generations in vivo. *MBio* 1.
113. Govan JR, Deretic V (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60: 539-574.
114. Breidenstein EB, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 19: 419-426.

115. Hoffman LR, Kulasekara HD, Emerson J, Houston LS, Burns JL, et al. (2009) *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J Cyst Fibros* 8: 66-70.
116. Didelot X, Walker AS, Peto TE, Crook DW, Wilson DJ (2016) Within-host evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Micro* 14: 150-162.
117. Haussler S, Ziegler I, Lottel A, von Gotz F, Rohde M, et al. (2003) Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol* 52: 295-301.
118. Starkey M, Hickman JH, Ma L, Zhang N, De Long S, et al. (2009) *Pseudomonas aeruginosa rugose* small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol* 191: 3492-3503.
119. Evans TJ (2015) Small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic bacterial infection of the lung in cystic fibrosis. *Future Microbiol* 10: 231-239.
120. Wei Q, Tarighi S, Dotsch A, Haussler S, Musken M, et al. (2011) Phenotypic and genome-wide analysis of an antibiotic-resistant small colony variant (SCV) of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 6: e29276.
121. Malone JG (2015) Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. *Infection and Drug Resistance* 8: 237-247.
122. Malone JG, Jaeger T, Spangler C, Ritz D, Spang A, et al. (2010) YfiBNR Mediates Cyclic di-GMP Dependent Small Colony Variant Formation and Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog* 6: e1000804.
123. Zierdt CH, Schmidt PJ (1964) Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 87: 1003-1010.
124. Thomassen MJ, Demko CA, Boxerbaum B, Stern RC, Kuchenbrod PJ (1979) Multiple of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* with differing antimicrobial susceptibility patterns from patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 140: 873-880.
125. Drenkard E, Ausubel FM (2002) *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416: 740-743.
126. D'Argenio DA, Calfee MW, Rainey PB, Pesci EC (2002) Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* 184: 6481-6489.
127. Meissner A, Wild V, Simm R, Rohde M, Erck C, et al. (2007) *Pseudomonas aeruginosa cupA*-encoded fimbriae expression is regulated by a GGDEF and EAL domain-dependent modulation of the intracellular level of cyclic diguanylate. *Environ Microbiol* 9: 2475-2485.
128. Webb JS, Lau M, Kjelleberg S (2004) Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 186: 8066-8073.
129. Mooij MJ, Drenkard E, Llamas MA, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH, et al. (2007) Characterization of the integrated filamentous phage Pf5 and its involvement in small-colony formation. *Microbiology* 153: 1790-1798.
130. Cui L, Neoh HM, Iwamoto A, Hiramatsu K (2012) Coordinated phenotype switching with large-scale chromosome flip-flop inversion observed in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E1647-1656.

131. Schneider M, Mühlemann K, Droz S, Couzinet S, Casaulta C, et al. (2008) Clinical Characteristics Associated with Isolation of Small-Colony Variants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from Respiratory Secretions of Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 1832-1834.
132. Byrd MS, Pang B, Hong W, Waligora EA, Juneau RA, et al. (2011) Direct evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm mediators in a chronic infection model. *Infect Immun* 79: 3087-3095.
133. Mulcahy H, O'Callaghan J, O'Grady EP, Macia MD, Borrell N, et al. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* RsmA plays an important role during murine infection by influencing colonization, virulence, persistence, and pulmonary inflammation. *Infect Immun* 76: 632-638.
134. Mena A, Smith EE, Burns JL, Speert DP, Moskowitz SM, et al. (2008) Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J Bacteriol* 190: 7910-7917.
135. Ferroni A, Guillemot D, Moumille K, Bernede C, Le Bourgeois M, et al. (2009) Effect of mutator *P. aeruginosa* on antibiotic resistance acquisition and respiratory function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 44: 820-825.
136. Kenna DT, Doherty CJ, Foweraker J, Macaskill L, Barcus VA, et al. (2007) Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. *Microbiology* 153: 1852-1859.
137. Oliver A (2010) Mutators in cystic fibrosis chronic lung infection: Prevalence, mechanisms, and consequences for antimicrobial therapy. *Int J Med Microbiol* 300: 563-572.
138. Montanari S, Oliver A, Salerno P, Mena A, Bertoni G, et al. (2007) Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* 153: 1445-1454.
139. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B (2007) Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 4062-4070.
140. Plasencia V, Borrell N, Macia MD, Moya B, Perez JL, et al. (2007) Influence of high mutation rates on the mechanisms and dynamics of in vitro and in vivo resistance development to single or combined antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 2574-2581.
141. Gutiérrez O, Juan C, Pérez JL, Oliver A (2004) Lack of Association between Hypermutation and Antibiotic Resistance Development in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Intensive Care Unit Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 3573-3575.
142. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND (2009) Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22.
143. Martinez-Solano L, Macia MD, Fajardo A, Oliver A, Martinez JL (2008) Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis* 47: 1526-1533.

144. Macia MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Perez JL, et al. (2005) Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3382-3386.
145. Moyano AJ, Feliziani S, Di Rienzo JA, Smania AM (2013) Simple Sequence Repeats Together with Mismatch Repair Deficiency Can Bias Mutagenic Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* during Chronic Lung Infection. *PLoS ONE* 8: e80514.
146. Lujan AM, Macia MD, Yang L, Molin S, Oliver A, et al. (2011) Evolution and adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators. *PLoS One* 6: e27842.
147. Moyano AJ, Smania AM (2009) Simple Sequence Repeats and Mucoïd Conversion: Biased *muca* Mutagenesis in Mismatch Repair-Deficient *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE* 4: e8203.
148. Moyano AJ, Lujan AM, Argarana CE, Smania AM (2007) MutS deficiency and activity of the error-prone DNA polymerase IV are crucial for determining *muca* as the main target for mucoïd conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 64: 547-559.
149. Lujan AM, Moyano AJ, Segura I, Argarana CE, Smania AM (2007) Quorum-sensing-deficient (*lasR*) mutants emerge at high frequency from a *Pseudomonas aeruginosa* *mutS* strain. *Microbiology* 153: 225-237.
150. Oliver A, Baquero F, Blazquez J (2002) The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol Microbiol* 43: 1641-1650.
151. Kunkel TA, Erie DA (2005) DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 74: 681-710.
152. Schofield MJ, Hsieh P (2003) DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annu Rev Microbiol* 57: 579-608.
153. Modrich P (2006) Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *The Journal of biological chemistry* 281: 30305-30309.
154. Evans E, Sugawara N, Haber JE, Alani E (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 mismatch repair protein localizes to recombination intermediates in vivo. *Mol Cell* 5: 789-799.
155. Junop MS, Yang W, Funchain P, Clendenin W, Miller JH (2003) In vitro and in vivo studies of MutS, MutL and MutH mutants: correlation of mismatch repair and DNA recombination. *DNA Repair (Amst)* 2: 387-405.
156. Li G-M (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18: 85-98.
157. Jiricny J (2013) Postreplicative Mismatch Repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5: a012633.
158. Modrich P, Lahue R (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem* 65: 101-133.
159. Ramsey DM, Wozniak DJ (2005) Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* 56: 309-322.
160. Martin DW, Holloway BW, Deretic V (1993) Characterization of a locus determining the mucoïd status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU shows sequence similarities with a *Bacillus sigma* factor. *J Bacteriol* 175: 1153-1164.

161. Mathee K, McPherson CJ, Ohman DE (1997) Posttranslational control of the *algT* (*algU*)-encoded σ^{22} for expression of the alginate regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (*AlgN*). *J Bacteriol* 179: 3711-3720.
162. Wood LF, Leech AJ, Ohman DE (2006) Cell wall-inhibitory antibiotics activate the alginate biosynthesis operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Roles of σ (*AlgT*) and the *AlgW* and *Prc* proteases. *Mol Microbiol* 62: 412-426.
163. Wood LF, Ohman DE (2009) Use of cell wall stress to characterize σ^{22} (*AlgT/U*) activation by regulated proteolysis and its regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 72: 183-201.
164. Boucher JC, Martinez-Salazar J, Schurr MJ, Mudd MH, Yu H, et al. (1996) Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. *J Bacteriol* 178: 511-523.
165. Martin DW, Schurr MJ, Mudd MH, Deretic V (1993) Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* into the alginate-producing form: inactivation of *mucB* causes conversion to mucoidy. *Mol Microbiol* 9: 497-506.
166. Wood LF, Ohman DE (2006) Independent regulation of *MucD*, an HtrA-like protease in *Pseudomonas aeruginosa*, and the role of its proteolytic motif in alginate gene regulation. *J Bacteriol* 188: 3134-3137.
167. Boucher JC, Yu H, Mudd MH, Deretic V (1997) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: characterization of *muc* mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect Immun* 65: 3838-3846.
168. Pulcrano G, Iula DV, Raia V, Rossano F, Catania MR (2012) Different mutations in *mucA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strains in cystic fibrosis patients and their effect on *algU* gene expression. *New Microbiol* 35: 295-305.
169. Tegova R, Tover A, Tarassova K, Tark M, Kivisaar M (2004) Involvement of Error-Prone DNA Polymerase IV in Stationary-Phase Mutagenesis in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* 186: 2735-2744.
170. Sanders LH, Rockel A, Lu H, Wozniak DJ, Sutton MD (2006) Role of *Pseudomonas aeruginosa* *dinB*-encoded DNA polymerase IV in mutagenesis. *J Bacteriol* 188: 8573-8585.
171. Ciofu O, Lee B, Johannesson M, Hermansen NO, Meyer P, et al. (2008) Investigation of the *algT* operon sequence in mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants. *Microbiology* 154: 103-113.
172. Wyckoff TJO, Thomas B, Hassett DJ, Wozniak DJ (2002) Static growth of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* selects for non-mucoid variants that have acquired flagellum-dependent motility. *Microbiology* 148: 3423-3430.
173. Bayliss CD, Palmer ME (2012) Evolution of simple sequence repeat-mediated phase variation in bacterial genomes. *Ann N Y Acad Sci* 1267: 39-44.
174. van der Woude MW, Bäumlér AJ (2004) Phase and Antigenic Variation in Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 581-611.
175. Henderson IR, Owen P, Nataro JP (1999) Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol* 33: 919-932.

176. Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, et al. (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 103.
177. Friedman L, Kolter R (2004) Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol* 186: 4457-4465.
178. Shannon CE (1997) The mathematical theory of communication. *MD Comput* 14: 306-317.
179. Hill TC, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol Ecol* 43: 1-11.
180. Stirling G, Wilsey B (2001) Empirical Relationships between Species Richness, Evenness, and Proportional Diversity. *The American Naturalist* 158: 286-299.
181. Lenski RE, Rose MR, Simpson SC, Tadler SC (1991) Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations. *The American Naturalist* 138: 1315-1341.
182. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, et al. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176.
183. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. 2015 67: 48.
184. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, et al. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)* 6: 80-92.
185. Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4: 1073-1081.
186. Malone JG, Jaeger T, Manfredi P, Dötsch A, Blanka A, et al. (2012) The YfiB/NR Signal Transduction Mechanism Reveals Novel Targets for the Evolution of Persistent *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Airways. *PLoS Pathog* 8: e1002760.
187. Romling U, Galperin MY, Gomelsky M (2013) Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77: 1-52.
188. Ha DG, O'Toole GA (2015) c-di-GMP and its Effects on Biofilm Formation and Dispersion: a *Pseudomonas Aeruginosa* Review. *Microbiol Spectr* 3: MB-0003-2014.
189. Simm R, Morr M, Kader A, Nimtz M, Romling U (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* 53: 1123-1134.
190. Hengge R (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Micro* 7: 263-273.
191. Lory S, Merighi M, Hyodo M (2009) Multiple activities of c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*: 51-52.
192. Valentini M, Filloux A (2016) Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *The Journal of Biological Chemistry* 291: 12547-12555.

193. Ryjenkov DA, Tarutina M, Moskvina OV, Gomelsky M (2005) Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol* 187: 1792-1798.
194. Schmidt AJ, Ryjenkov DA, Gomelsky M (2005) The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. *J Bacteriol* 187: 4774-4781.
195. Chou SH, Galperin MY (2016) Diversity of Cyclic Di-GMP-Binding Proteins and Mechanisms. *J Bacteriol* 198: 32-46.
196. Hengge R, Grundling A, Jenal U, Ryan R, Yildiz F (2016) Bacterial Signal Transduction by Cyclic Di-GMP and Other Nucleotide Second Messengers. *J Bacteriol* 198: 15-26.
197. Seshasayee AS, Fraser GM, Luscombe NM (2010) Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Res* 38: 5970-5981.
198. Hengge R (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 7: 263-273.
199. Hickman JW, Tifrea DF, Harwood CS (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 14422-14427.
200. Newman JR, Fuqua C (1999) Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. *Gene* 227: 197-203.
201. Giardina G, Paiardini A, Fernicola S, Franceschini S, Rinaldo S, et al. (2013) Investigating the allosteric regulation of YfiN from *Pseudomonas aeruginosa*: clues from the structure of the catalytic domain. *PLoS One* 8: e81324.
202. O'Connor JR, Kuwada NJ, Huangyutitham V, Wiggins PA, Harwood CS (2012) Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production. *Mol Microbiol* 86: 720-729.
203. García-Fontana C, Reyes-Darias JA, Muñoz-Martínez F, Alfonso C, Morel B, et al. (2013) High Specificity in CheR Methyltransferase Function: Cher2 of *Pseudomonas putida* is essential for chemotaxis, whereas cher1 is involved in biofilm formation. *The Journal of Biological Chemistry* 288: 18987-18999.
204. Yang X, Yang XA, Xu M, Zhou L, Fan Z, et al. (2015) Crystal structures of YfiR from *Pseudomonas aeruginosa* in two redox states. *Biochem Biophys Res Commun* 461: 14-20.
205. Li S, Li T, Xu Y, Zhang Q, Zhang W, et al. (2015) Structural insights into YfiR sequestering by YfiB in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Sci Rep* 5: 16915.
206. Ha D-G, Richman ME, O'Toole GA (2014) Deletion Mutant Library for Investigation of Functional Outputs of Cyclic Diguanylate Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 3384-3393.
207. Lind PA, Farr AD, Rainey PB (2015) Experimental evolution reveals hidden diversity in evolutionary pathways. *Elife* 4.

208. Choy WK, Zhou L, Syn CK, Zhang LH, Swarup S (2004) MorA defines a new class of regulators affecting flagellar development and biofilm formation in diverse *Pseudomonas* species. *J Bacteriol* 186: 7221-7228.
209. Purssell A, Poole K (2013) Functional characterization of the NfxB repressor of the *mexCD-oprJ* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 159: 2058-2073.
210. Shiba T, Ishiguro K, Takemoto N, Koibuchi H, Sugimoto K (1995) Purification and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* NfxB protein, the negative regulator of the *nfxB* gene. *J Bacteriol* 177: 5872-5877.
211. Wong A, Rodrigue N, Kassen R (2012) Genomics of Adaptation during Experimental Evolution of the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Genet* 8: e1002928.
212. Jeannot K, Elsen S, Kohler T, Attree I, van Delden C, et al. (2008) Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 2455-2462.
213. Mulet X, Macia MD, Mena A, Juan C, Perez JL, et al. (2009) Azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: bactericidal activity and selection of *nfxB* mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 1552-1560.
214. Oberto J (2013) SyntTax: a web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. *BMC Bioinformatics* 14: 4.
215. Xu M, Yang X, Yang X-A, Zhou L, Liu T-Z, et al. (2016) Structural insights into the regulatory mechanism of the *Pseudomonas aeruginosa* YfiBNR system. *Protein & Cell* 7: 403-416.
216. Kulasakara H, Lee V, Brennic A, Liberati N, Urbach J, et al. (2006) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2839-2844.
217. Traverse CC, Mayo-Smith LM, Poltak SR, Cooper VS (2013) Tangled bank of experimentally evolved *Burkholderia* biofilms reflects selection during chronic infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: E250-E259.
218. Mikkelsen H, Hui K, Barraud N, Filloux A (2013) The pathogenicity island encoded PvrSR/RcsCB regulatory network controls biofilm formation and dispersal in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Mol Microbiol* 89: 450-463.
219. Cooper VS, Staples RK, Traverse CC, Ellis CN (2014) Parallel evolution of small colony variants in *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Genomics* 104: 447-452.
220. O'Rourke D, FitzGerald CE, Traverse CC, Cooper VS (2015) There and back again: consequences of biofilm specialization under selection for dispersal. *Frontiers in Genetics* 6: 18.
221. Mikkelsen H, Ball G, Giraud C, Filloux A (2009) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* CupDFimbrial Genes Is Antagonistically Controlled by RcsB and the EAL-Containing PvrR Response Regulators. *PLoS ONE* 4: e6018.
222. Blanka A, Düvel J, Dötsch A, Klinkert B, Abraham W-R, et al. (2015) Constitutive production of c-di-GMP is associated with mutations in a variant of *Pseudomonas aeruginosa* with altered membrane composition. *Science Signaling* 8: ra36-ra36.

223. Moxon R, Bayliss C, Hood D (2006) Bacterial contingency loci: the role of simple sequence DNA repeats in bacterial adaptation. *Annu Rev Genet* 40: 307-333.
224. Bichara M, Wagner J, Lambert IB (2006) Mechanisms of tandem repeat instability in bacteria. *Mutat Res* 598: 144-163.
225. Bayliss CD, Field D, Moxon ER (2001) The simple sequence contingency loci of *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*. *Journal of Clinical Investigation* 107: 657-666.
226. Hammerschmidt S, Muller A, Sillmann H, Muhlenhoff M, Borrow R, et al. (1996) Capsule phase variation in *Neisseria meningitidis* serogroup B by slipped-strand mispairing in the polysialyltransferase gene (*siaD*): correlation with bacterial invasion and the outbreak of meningococcal disease. *Mol Microbiol* 20: 1211-1220.
227. McDonald MJ, Gehrig SM, Meintjes PL, Zhang X-X, Rainey PB (2009) Adaptive Divergence in Experimental Populations of *Pseudomonas fluorescens*. IV. Genetic Constraints Guide Evolutionary Trajectories in a Parallel Adaptive Radiation. *Genetics* 183: 1041-1053.
228. Rainey PB, Travisano M (1998) Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* 394: 69-72.
229. Hammerschmidt K, Rose CJ, Kerr B, Rainey PB (2014) Life cycles, fitness decoupling and the evolution of multicellularity. *Nature* 515: 75-79.
230. Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, Lindum PW, Campbell JI, et al. (1999) Mucoïd conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology* 145 (Pt 6): 1349-1357.
231. Martin DW, Schurr MJ, Mudd MH, Govan JR, Holloway BW, et al. (1993) Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 8377-8381.
232. Bragonzi A, Wiehlmann L, Klockgether J, Cramer N, Worlitzsch D, et al. (2006) Sequence diversity of the mucABD locus in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* 152: 3261-3269.
233. Drake JW, Charlesworth B, Charlesworth D, Crow JF (1998) Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics* 148: 1667-1686.
234. Liberati NT UJ, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wei T, and Ausubel FM (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci* 103(8): 2833-2838.
235. Koch B, Jensen LE, Nybroe O (2001) A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J Microbiol Methods* 45: 187-195.
236. Bao Y, Lies DP, Fu H, Roberts GP (1991) An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene* 109: 167-168.
237. Finan TM, Kunkel B, De Vos GF, Signer ER (1986) Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J Bacteriol* 167: 66-72.

238. Hickman JW TD, Harwood CS. (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci* 102(40):14422-7.
239. O'Toole GA (2011) Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*.
240. Choi KH, Schweizer HP (2006) mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc* 1: 153-161.
241. Gringauz E, Orle KA, Waddell CS, Craig NL (1988) Recognition of *Escherichia coli* attTn7 by transposon Tn7: lack of specific sequence requirements at the point of Tn7 insertion. *J Bacteriol* 170: 2832-2840.
242. Finan TM, Kunkel B, De Vos GF, Signer ER (1986) Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *Journal of Bacteriology* 167: 66-72.
243. Pezza RJ, Smania AM, Barra JL, Argaraña CE (2002) Nucleotides and heteroduplex DNA preserve the active conformation of *Pseudomonas aeruginosa* MutS by preventing protein oligomerization. *Biochemical Journal* 361: 87-95.
244. Froger A, Hall JE (2007) Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*: 253.
245. Choi KH, Kumar A, Schweizer HP (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* 64: 391-397.
246. Li H, Durbin R (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26: 589-595.
247. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, et al. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078-2079.
248. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, et al. (2010) The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research* 20: 1297-1303.
249. Cingolani P, Patel VM, Coon M, Nguyen T, Land SJ, et al. (2012) Using *Drosophila melanogaster* as a Model for Genotoxic Chemical Mutational Studies with a New Program, SnpSift. *Front Genet* 3: 35.
250. Simm R, Morr M, Remminghorst U, Andersson M, Romling U (2009) Quantitative determination of cyclic diguanosine monophosphate concentrations in nucleotide extracts of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* 386: 53-58.
251. CLSI (2014) Performance standars for antimicrobial susceptibility testing; 24th informational supplement. . Clinical & Laboratory Standards Institute, Wayne PA.