



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

**Dr. Alejandro J. Yáñez**

Instituto de Bioquímica y Microbiología

Facultad de Ciencias

**CARACTERIZACIÓN GENÓMICA Y PROTEÓMICA  
DEL PILI TIPO IV DE *Piscirickettsia salmonis***

Tesis de Grado presentada como parte de  
los requisitos para optar al grado de  
***Licenciado en Bioquímica*** y Título  
Profesional de ***Bioquímico***

**PATRICIO ANDRÉS SÁNCHEZ CÁRCAMO  
VALDIVIA – CHILE  
2017**

*Para mis padres, Cecilia y Ramón.*

*Para Marcela, Leonor y Malú.*



## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que me han ayudado en este largo proceso. Lamentablemente, tanto el espacio del que dispongo y mi habilidad para describir de manera fidedigna en pocos párrafos la real importancia de todos y cada uno de ustedes son limitadas, pero haré un esfuerzo honesto.

Quiero agradecer al laboratorio donde he aprendido ya por varios años. Al profesor Yáñez por darme la bienvenida, su trato cordial, y por darme a mí y otros la libertad de trabajar con ideas propias. A Ronie y Cristian, que me han guiado, los considero mentores y ejemplos de investigadores. También a Rodrigo y Marcos, que siempre tuvieron la mejor disposición para ayudarme. A todos los que alguna vez estuvieron en el laboratorio, ya sea en el grupo de peces o el *team* diabetes, muchas gracias por los buenos momentos.

No puedo dejar de mencionar a mis amigos de la carrera, con quiénes pasé todos estos años, muchas gracias a todos Los Guais (Marquitos, Feña, Tania, Pablito, Felipe y Miguel), los aprecio muchísimo. También a mis amigos en Puerto Montt, que han permanecido a mi lado. Y a Mori, que me ha acompañado en la recta final de este proceso.

Quiero agradecer a mis padres por su paciencia y constancia. Finalmente, quiero darle las gracias a mi hermana, que ha sido verdaderamente, mi gran soporte y mi mejor amiga. Muchas gracias Marce, por todos estos años. Y también a tus niñas, Malú y Leonor, por todas las alegrías que me dan a diario.

También agradezco a mi fuente de financiamiento. Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDAP-INCAR 15110027.

## ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN.....	1
1.1. SUMMARY .....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. El <i>pilus</i> o <i>pili</i> bacteriano.....	5
2.2. El <i>pilus</i> de tipo IV ( <i>Tfp</i> ).....	6
2.3. Clasificación y funciones de los <i>pili</i> de tipo IV .....	7
2.4. Componentes y biogénesis del <i>pili</i> tipo IV .....	10
2.5. El <i>pilus</i> de tipo IV como modulador de la respuesta inmune.....	15
2.6. Motivación del trabajo .....	16
2.7. Hipótesis .....	17
2.7.1. Objetivo general.....	17
2.7.2. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1. Materiales.....	18
3.1.1. Material biológico.....	18
3.1.2. Reactivos.....	18
3.1.3. Soluciones .....	19

3.1.4.	Kits.....	20
3.1.5.	Equipos.....	21
3.1.6.	Software .....	21
3.2.	Métodos .....	22
3.2.1.	Condiciones de cultivo.....	22
3.2.2.	Análisis <i>in silico</i> de pili tipo IV de <i>P. salmonis</i> .....	22
3.2.3.	Diseño de partidores.....	23
3.2.4.	Extracción de ADN y detección de genes de pili tipo IV por PCR .....	26
3.2.5.	Ensayo de infección celular .....	26
3.2.6.	Extracción de ARN .....	27
3.2.7.	Síntesis de ADNc.....	27
3.2.8.	PCR cuantitativo (qPCR).....	28
3.2.9.	Preparación del extracto proteico .....	30
3.2.10.	Lisis de muestras proteicas para espectrometría de masas.....	30
3.2.11.	Análisis de identificación proteica.....	31
3.2.12.	Análisis de datos MS/MS.....	32
3.2.13.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	32
4.	RESULTADOS .....	34
4.1.	Identificación <i>in silico</i> y caracterización de genes putativos de pili tipo IV en <i>P. salmonis</i> .....	34

4.2. Expresión génica a nivel de transcrito de los genes de pili tipo IV durante una infección <i>in vitro</i> .....	34
4.3. Análisis de proteínas putativas codificadas por genes de pili tipo IV de <i>P. salmonis</i> .....	39
4.4. Análisis proteómico de pili tipo IV e identificación de PilA.....	42
4.5. Identificación de estructuras tipo pili en la superficie de <i>P. salmonis</i> . ....	45
5. DISCUSIÓN.....	49
6. BIBLIOGRAFÍA.....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Modelo de biogénesis de pili tipo IV para <i>Francisella tularensis</i> .....	11
Figura 2.	Modelo de biogénesis de pili tipo IV para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	12
Figura 3.	Organización de los genes hallados de pili tipo IV en el genoma de <i>P. salmonis</i> LF-89 .....	35
Figura 4.	Distribución y análisis comparativo de los genes de pili tipo IV en $\gamma$ -proteobacteria .....	36
Figura 5.	Amplificación por PCR de los genes del pili tipo IV en <i>P. salmonis</i> LF-89 .....	37
Figura 6.	S...	€
Figura 7.	Alineamiento múltiple de la región conservada N-terminal de la proteína putativa PilA de <i>P. salmonis</i> con bacterias relacionadas .....	43
Figura 8.	Estructura predicha para la proteína PilA de <i>P. salmonis</i> y <i>P. aeruginosa</i> cepa PAK .....	44
Figura 9.	Micrografía electrónica de estructuras tipo pili de <i>P. salmonis</i> .....	48

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla I.	Diferencias entre los dos subtipos de pili tipo IV .....	9
Tabla II.	Primers usados para PCR convencional .....	24
Tabla III.	Primers usados para análisis de qRT-PCR .....	25
Tabla IV.	Primers usados para la normalización de la expresión relativa de genes de pili tipo IV mediante qRT-PCR .....	29
Tabla V.	Propiedades de genes/proteínas putativas de <i>P. salmonis</i> LF-89 .....	40
Tabla VI.	Proteínas involucradas en biogénesis y función del pili tipo IV de <i>P. salmonis</i> identificadas por análisis proteómico .....	46
Tabla VII.	Péptidos identificados por análisis proteómico que coinciden con la secuencia de la proteína PilA de <i>P. salmonis</i> LF-89 .....	47

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	albúmina de suero de bovino
DAB	Diaminobencidina
DTT	Dithiothreitol
EDTA	ácido etilendiamino tetracético
IgG	Inmunoglobulina G
M-MLV RT	<i>Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase</i>
PBS	tampón fosfato salino
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<i>P. salmonis</i>	<i>Piscirickettsia salmonis</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
SFB	Suero fetal bovino
SDS	dodecyl sulfato de sodio
SHK-1	<i>Salmon Head Kidney-1</i>
SRS	Septicemia Rickettsial del Salmón (Piscirickettsiosis)
<i>S. salar</i>	<i>Salmo salar</i>

T2SS	Sistema de secreción tipo II (Type II secretion system)
TBS	Tert-butildimetilsilil
Temed	N, N,N',N'-tetrametiletilendiamina
Tfp	Pili tipo IV ( <i>Type IV pili</i> )
TfpA	Pili tipo IV subtipo A
Tris	tris(hidroximetil)aminometano, $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$

## 1. RESUMEN

*Piscirickettsia salmonis* es una  $\gamma$ -proteobacteria Gram-negativa perteneciente a la orden de los thiotrichales, de carácter intracelular facultativo y es el agente etiológico de la septicemia rickettsial del salmón (SRS) o Piscirickettsiosis, que causa enormes dificultades a la industria de la salmonicultura chilena.

Uno de los atributos de virulencia más importantes de las bacterias de carácter patogénico es su capacidad para adherirse a las superficies del huésped. Uno de los mecanismos más empleados por las bacterias es el uso de pili, apéndices que se extienden desde la superficie bacteriana y están compuestos de múltiples unidades de una misma proteína. Entre estos el pilus de tipo IV es el más estudiado y ubicuo en los diversos linajes bacterianos. En los genomas publicados de *P. salmonis* se han identificado genes relacionados a pilus tipo IV subtipo A, pero no han sido caracterizados en su conjunto, lo cual fue el objetivo general de este trabajo.

Específicamente, se identificaron genes y proteínas relacionados a pilus tipo IV en *P. salmonis*, se evaluó su expresión a nivel de transcrito durante la infección, se identificaron proteínas de pilus tipo IV (entre ellas la proteína PilA, subunidad principal del filamento) mediante aproximaciones proteómicas y, a través de microscopía electrónica, se observaron filamentos cuya morfología corresponde a pili tipo IV. Estos resultados sugieren la presencia de pilus tipo IV en *P. salmonis* y permiten realizar futuros estudios a fin de evaluar el potencial del pili de *P. salmonis* como inmunomodulador y parte de formulaciones de potenciales adyuvantes y/o vacunas.

## 1.1. SUMMARY

*Piscirickettsia salmonis* is an intracellular gammaproteobacteria which belongs in the order thiotrichales, and it's the etiological agent of salmonid rickettsial septicaemia (SRS), which causes enormous difficulties to the Chilean salmon industry.

One of the most important virulence attributes in pathogenic bacteria is their ability to adhere to host cell surface. A widely employed mechanism is the use of pili, which are appendages that extend from the bacterial membrane and are formed by multiple polymers of a single protein. Of the several types of pili, the Type IV pili (Tfp) is the most widespread among bacterial lineages. Several Tfp-related genes have been identified in *P. salmonis* genomes, but they haven't been characterized, this being the main objective of the present study.

Specifically, Tfp-related genes across the genome were identified, showing differential expression profiles of these genes during infection. Additionally, several Tfp proteins were discovered (among them the main pilus subunit protein PilA) through proteomic approaches and TEM revealed the presence of filaments with a Tfp-like morphology. These results suggest the presence of a Tfp in *P. salmonis* and paves the way for future studies in order to evaluate *P. salmonis* pili as a modulator of the immune system and therefore its potential as a vaccine and/or adjuvant component.

## 2. INTRODUCCIÓN

*Piscirickettsia salmonis* es una fastidiosa  $\gamma$ -proteobacteria Gram-negativa perteneciente al orden de los thiotrichales, pleomórfica, aunque generalmente cocoide y con un diámetro aproximado entre 0,5 – 1,5  $\mu\text{m}$ . Este patógeno constituye el agente etiológico de la Piscirickettsiosis, también conocida como Septicemia Rickettsial del Salmón o SRS (Rozas y Enríquez, 2014; Fryer *et al.* 1992), patología de mayor interés dentro de la salmonicultura nacional, puesto que es causante del 79,8% de la mortalidad secundaria en salmónidos de cultivo (Sernapesca, 2017), lo cual se traduce en cuantiosas pérdidas económicas para la industria calculadas, con estimaciones de entre 100 y 150 millones de dólares al año (Balin, 2015) y el alto uso de antimicrobianos, el cual para el año 2016 alcanzó las 382,5 toneladas para una cosecha de 727.812 toneladas, casi el doble empleado, por ejemplo, en 2011 cuando se administraron 206,8 tons para una cosecha de 649.492 toneladas, lo que constituye una progresión preocupante (Sernapesca, 2017).

En salmónidos, los signos externos más consistentes asociados a una infección con *P. salmonis* son una palidez en las agallas resultado de una anemia severa, lesiones abdominales, nado errático, inapetencia y hemorragias en la base de las aletas, en las zonas periorcular y perianal (Bravo y Campos, 1989; Cvitanich *et al.* 1990). Las infecciones por *P. salmonis* suelen diseminarse de manera sistémica, generando ascitis y lesiones en riñones, hígado y bazo. También se suelen observar petequias en vísceras, en la pared de la vejiga natatoria y músculo esquelético en general (Branson y Díaz-Muñoz, 1991). Microscópicamente, se observan lesiones en hígado, riñón, bazo e

intestino. *P. salmonis* se suele observar en macrófagos, dentro de vacuolas citoplasmáticas de las células hospederas (Schäfer *et al.* 1990). En infecciones de carácter agudo, se aprecia una necrosis generalizada, que resulta en órganos de apariencia moteada, y al observar estas zonas de necrosis a través de microscopía se presentan agregados intracelulares de *P. salmonis* en macrófagos.

En cuanto a los mecanismos que facilitan la infección de *P. salmonis* a las células hospederas, estudios basados en el análisis de transcriptomas muestran un aumento en la expresión de genes relacionados con la respuesta innata y respuestas proinflamatorias, junto con una baja en la expresión de genes involucrados en respuestas inmunes celulares. (Tacchi *et al.* 2011, Rozas-Serri *et al.* 2017). Otros mecanismos que han sido postulados como importantes para el éxito de la infección por *P. salmonis* son la supresión de vías de señalización que dependen de proteína G y sistemas antioxidantes del hospedero (Almendras *et al.* 2000; Tacchi *et al.* 2011) e inhibición de la apoptosis (Rise *et al.* 2004). Además, se han caracterizado algunos factores importantes de virulencia, como sistemas toxina-antitoxina (Gómez *et al.* 2011), un sistema de secreción tipo IV que permite liberar proteínas efectoras y es fundamental para la replicación intracelular en patógenos como *Legionella pneumophila* y *Coxiella burnetii* (Gómez *et al.* 2013; Cortés *et al.* 2017) y vesículas de membrana externa que contienen toxinas putativas las cuales podrían cumplir roles importantes en patogénesis (Oliver *et al.* 2017).

Por todo lo anterior, la Piscirickettsiosis es uno de los factores de riesgo más importantes que debe enfrentar la salmonicultura chilena, de ahí la importancia de

comprender y estudiar los mecanismos y factores que determinan la virulencia de este patógeno, entre los cuales se podría encontrar el pilus.

### **2.1. El *pilus* o *pili* bacteriano**

Pilus (*pili* en plural) es un apéndice que se encuentra en la superficie de una gran variedad de bacterias, principalmente Gram-negativas, no obstante, esta estructura también ha podido ser identificada en bacterias Gram-positivas. Es usual que se utilice el término fimbria para referirse al pilus o viceversa, aunque en algunos casos se hace una distinción de carácter informal en base a, ya sea su capacidad de realizar transferencia de material genético entre bacterias de igual o distinta especie, en un proceso conocido como conjugación bacteriana, y/o el número de apéndices presentes en cada célula, considerándose que las fimbrias se encuentran presentes en mayor cantidad en una bacteria. Su rol más común es el de mediar el contacto entre bacterias y tejidos del hospedero durante infección, entre bacterias y otras superficies o el contacto entre bacterias cercanas, con consecuencias que van desde la generación de fuerza mecánica para ejercer motilidad, favorecer la formación de microcolonias y/o biopelículas, transportar material genético entre bacterias o facilitar la infección de la célula objetivo (Georgiadou y Pelicic, 2014; Hospenthal *et al.* 2017).

En bacterias Gram-negativas, se han caracterizado varios tipos de pili. Los más estudiados son los pili de tipo 1/P, encontrados en variantes enteropatogénicas de *Escherichia coli* y que son ensamblados por la vía chaperona-usher PapD (Thanassi *et al.* 1998); pili de tipo rizado o *curli*, caracterizado en algunas cepas de *E. coli*, está

formado por subunidades de la proteína CsgA y se caracteriza por tener un alto nivel de agregación y poseer una estructura tipo amiloide (Chapman *et al.* 2002); pili tipo V, recientemente caracterizado y estudiado principalmente en patógenos orales como *Porphyromonas gingivalis* y en el phylum *Bacteroidetes* (Xu *et al.* 2016) y el pilus de tipo IV, estudiado principalmente en *Neisseria meningitidis* y *Pseudomonas aeruginosa*, pero que se encuentra distribuido en gran cantidad de linajes, incluso siendo observado en arqueas (Pohlschroder *et al.* 2011).

## **2.2. El pilus de tipo IV (*Tfp*)**

Como se mencionó anteriormente, el pilus de tipo IV (*Tfp*, *type IV pili*) es el de mayor distribución entre especies bacterianas tanto Gram-negativas como Gram-positivas (Melville y Craig, 2013) y en una enorme variedad de géneros, desde cianobacterias hasta *Firmicutes* pasando por *Deinococcus* (Pelicic, 2008). Así, se ha considerado como un importante factor de virulencia debido a su condición de apéndice que sale de la membrana externa, participando en procesos de adhesión a superficies tanto bióticas como abióticas, captación de DNA foráneo durante procesos conjugativos y motilidad (Mattick, 2002; Giltner, 2012). Varias de estas funciones son posibles gracias a la habilidad del pili tipo IV para retraerse, lo que genera fuerza mecánica (Maier *et al.* 2002). Desde el punto de vista morfológico, suelen ser filamentos de 5-8 nm de ancho y pueden alcanzar varias micras de largo, con la capacidad de formar haces cuando los filamentos se unen lateralmente. Además son estructuras homogéneas, puesto que están

constituidas por múltiples unidades de una proteína única llamada PilA. (Georgiadou y Pelicic, 2014).

### **2.3. Clasificación y funciones de los pili de tipo IV**

Los pili de tipo IV generalmente son considerados como estructuras necesarias para la adherencia, motilidad y captación de ADN, sin embargo, poseen una amplia gama de funciones muy diversas, como actuar de receptores para bacteriófagos (Bertozzi-Silva *et al.* 2016), contribuir a la formación de biopelículas y/o agregados bacterianos (Mattick, 2002) y actuar como nanohilos (*nanowires*), siendo capaces de transportar electrones entre bacterias (Sure *et al.*, 2015), pero son las tres primeras funciones mencionadas las de mayor preponderancia.

La adhesión mediada por pilus ha sido estudiada principalmente en *P. aeruginosa* cepa PAK y *Neisseria spp.* En la primera, los pili son las principales adhesinas que se unen a superficies mucosas (Doig *et al.*, 1988) y se unen a receptores en las células epiteliales, principalmente asialo-GM1 y GM2, ambos glicolípidos (Krivan *et al.* 1988). En el caso del pilus de *Neisseria spp.*, es fundamental en etapas tempranas de la infección al promover la adhesión de la bacteria a las células (Swanson, 1973), y su receptor es la glicoproteína de transmembrana CD46, la cual está presente en todas las células, a excepción de los eritrocitos. En ambos casos, los sitios de unión de la proteína pilina (PilA) suelen estar ubicados en la zona C-terminal, de gran variabilidad entre cepas, pero que, sin embargo, mantienen el reconocimiento de su receptor (Craig *et al.* 2004).

La motilidad mediada por pili tipo IV se denomina *twitching motility*, es una forma de motilidad “espásmica” o “a tirones”, aprovechando la capacidad de retracción del pilus para generar fuerza mecánica. Fenotípicamente, se observa que aquellas bacterias capaces de realizar este tipo de motilidad forman colonias más planas en agar y de mayor viscosidad. Este tipo de motilidad puede observarse tanto en superficies bióticas como también en sustratos inertes como vidrio, cuarzo o poliestireno (Mattick, 2002).

Finalmente, el papel del pili tipo IV en captación (*uptake*) de DNA se basa en el análisis electrostático de la superficie de las fibras de pili tipo IV de *P. aeruginosa*, que dan cuenta de la capacidad del pilus tipo IV para unir ADN debido a propiedades emergentes de su estructura cuaternaria (van Schaik *et al.*, 2005). Además, en *N. gonorrhoeae* se ha observado que una disrupción en la expresión del pilus tipo IV; también anula la capacidad de la bacteria para captar material genético foráneo (Wolfgang *et al.*, 1998) y que esta capacidad depende también de algunas proteínas no necesarias para la formación o función del pilus de tipo IV, como las proteínas ComE y ComP (Aas *et al.* 2002).

Respecto de la clasificación de los pili tipo IV existe un consenso en separarlos en dos grandes subtipos: TfpA y TfpB, los primeros presentes en una mayor variedad de especies (Pelicic, 2008). Como se muestra en la Tabla I, las características de los péptidos de señal y el largo de la proteína que forma el pilus, además de otros elementos de carácter principalmente genómico, determinan ambos subtipos.

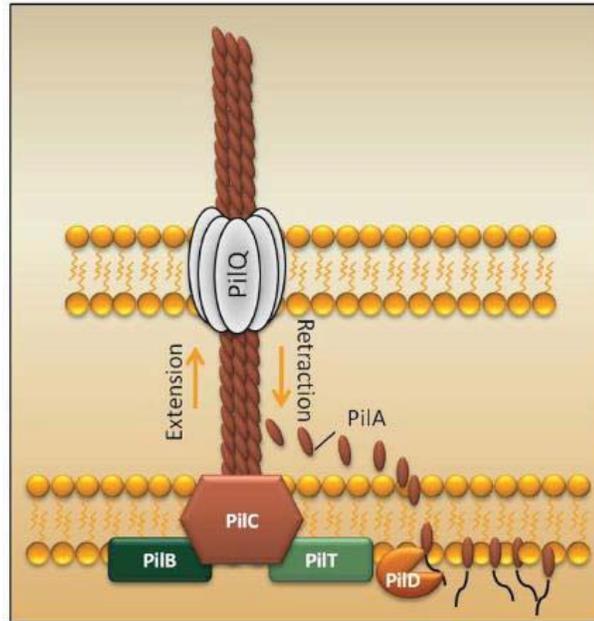
**Tabla I.** Diferencias entre los dos subtipos de pili tipo IV.

Característica	TfpA	TfpB
Longitud del péptido líder (leader peptide)	< 10 aá	15-30 aá
Longitud pilus	150 – 160 aá	40 – 50 aá o 180 – 200 aá
N.º de proteínas requeridas para formación	~15 o más	~10
Organización genómica	Disperso en pequeños clusters	Altamente clusterizado

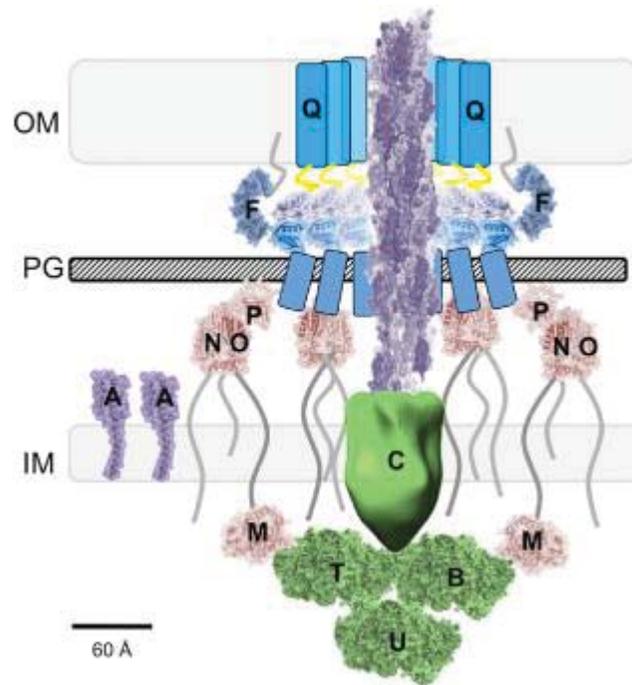
## 2.4. Componentes y biogénesis del pili tipo IV

Estudios genómicos han permitido determinar el set de proteínas requeridas para la biogénesis y funcionamiento del pilus de tipo IV. Debido a que se ha trabajado en diferentes modelos bacterianos, los ortólogos de cada componente tienen diferente nomenclatura dependiendo de la bacteria con la cual se está trabajando (Craig y Li, 2008). Además, la homología parcial que existe entre elementos del pili tipo IV y del sistema de secreción tipo II (T2SS) complican más esta nomenclatura (Peabody *et al.* 2003). Así, los prefijos más usuales son Pil (para TfpA correspondientes a *N. meningitidis* y *P. aeruginosa*), Bfp (Bundle-forming pilus, TfpB caracterizado en *E. coli* y Tcp *Toxin conditioned pilus*, TfpB caracterizado en *Vibrio cholerae*) y Gsp para los elementos de los sistemas de secreción tipo II.

Las diferencias en cuanto a complejidad del sistema pueden ser notorias. Por ejemplo, *P. aeruginosa* consta de más de 18 proteínas (Pelicic, 2008), mientras que *N. meningitidis* requiere de 15 proteínas para la generación del pilus (Carbonnelle *et al.*, 2006). Así mismo, existen estudios en *Francisella tularensis*, organismo filogenéticamente cercano a *P. salmonis*, que presenta pilus de tipo IV y un sistema de menor complejidad, con alrededor de 8~10 proteínas constituyentes identificadas. (Zogaj *et al.*, 2008; Salomonsson *et al.*, 2011). Estas diferencias en la aparente complejidad de los sistemas involucrados en la formación del pilus tipo IV se reflejan en los modelos que han sido generados para explicarlos, como se puede apreciar en las Figuras 1 y 2, donde se muestran modelos para *F. tularensis* y *P. aeruginosa*, respectivamente. A pesar de las



**Figura 1.** Modelo de biogénesis de pili tipo IV para *Francisella tularensis*. (adaptado de Salomonsson *et al.* 2011)



**Figura 2.** Modelo de biogénesis de pili tipo IV para *Pseudomonas aeruginosa*.

(adaptado de Leighton *et al.* 2015)

variaciones, existe consenso acerca de algunos elementos que son fundamentales para la biogénesis del pili de tipo IV en diferentes bacterias, entre ellos se cuentan:

- I) La proteína formadora del pilus, también llamada subunidad principal o simplemente pilina PilA, con péptido inicial corto o de señal tipo III y una estructura formada por varias hélices en el N-terminal que dan vuelta cada 5 residuos generando una fibra larga, la cual termina en una zona C-terminal con varias hojas beta agrupadas en una conformación hidrófoba, generando una cabeza globular. Esta estructura básica se conserva en gran parte de los pili tipo IV, pero la estructura y ángulos de los giros y las hojas puede variar considerablemente (Craig, 2004).
- II) La peptidasa PilD, encargada de procesar el pre-pilus a su forma de pilina madura. Para esto es necesaria la presencia de un residuo de glicina invariable en la región N-terminal de PilA y el ácido glutámico en la posición +5, los cuales son fundamentales para que la peptidasa pueda funcionar de manera correcta. Adicionalmente, la función de la peptidasa también depende de dos residuos de aspartato en regiones concretas, por ejemplo, en las posiciones 125 y 189 de la peptidasa TcpJ de *V. cholerae* (LaPointe y Taylor, 2000).
- III) PilC, una proteína integral de membrana que sirve como punto de anclaje para las primeras unidades de PilA y ambas ATPasas. Estudios demuestran que PilC forma una estructura de domo o plataforma, ubicándose entre las ATPasas (con el dominio N-terminal unido a PilB y el C-terminal unido a PilT) y transduce la energía generada por éstas hacia la extensión o retracción del pili (Chang *et al.*, 2016).

- IV) PilQ, una secretina que se agrupa en 12 unidades multiméricas que forman un poro a través del cual el pili emerge hacia la superficie celular (Collins *et al.*, 2001; Carbonnelle *et al.*, 2006), cuya función es asistida por la proteína accesoria PilF, estabilizando este anillo (Szeto *et al.* 2011).
- V) La ATPasa PilB que genere la tracción necesaria para la salida del pili desde la superficie de la bacteria. Esta es una proteína de carácter hexamérica y su participación en la formación del pili de tipo IV no está del todo clara, pero se cree que al unir nucleótidos puede generar cambios conformacionales, actuando como un motor molecular, otorgando la energía necesaria para la incorporación de más subunidades de pilina PilA (Nunn *et al.*, 1990).

Además de éstas, se encuentran otras proteínas relacionadas con la optimización de etapas del proceso de biogénesis, como PilM, PilN, PilO y PilP, que interactúan entre sí estabilizando la estructura mediante la interacción de su complejo con la secretina PilQ. Además, las proteínas PilG, PilH, PilJ y PilK actúan como reguladores finos de los procesos de extensión y retracción del pili, ejerciendo una función similar a PilW, mencionado anteriormente. Por otra parte, se ha descrito la capacidad de este complejo para formar pseudo-pilus, de menor extensión y sin la funcionalidad del pili tipo IV convencional (Tammam *et al.*, 2014).

Todos estos antecedentes reafirman la importancia del pili tipo IV como un factor de virulencia importante para diversas bacterias patogénicas, lo que ha sido ampliamente explorado (Melville y Craig, 2013; Berry *et al.*, 2015). Sin embargo, actualmente no

existen estudios en relación a la existencia del pilus y caracterización de éste en *P. salmonis*, lo cual será un objetivo central de esta investigación.

## **2.5. El pilus de tipo IV como modulador de la respuesta inmune**

El potencial de componentes de pilus de tipo IV como factores terapéuticos en forma de vacuna, ya sea como componente principal o como adyuvante, ha sido evaluado en varias especies, con resultados variables (Fernandes *et al.*, 2007; Horzempa *et al.*, 2008; Cehovin *et al.*, 2011; Banadkoki *et al.*, 2016; Korpi *et al.*, 2016; Loh *et al.*, 2017). Una dificultad a la hora de utilizar pili para generar vacunas que permitan interferir con la función adhesiva que se le atribuye durante la infección es la capacidad de algunas especies bacterias de generar recombinación en zonas hipervariables, por ejemplo en la región C-terminal de PilA de *N. gonorrhoeae* (Hagblom *et al.* 1985). Sin embargo, se ha demostrado que los componentes del pili tipo IV son altamente inmunogénicos y se han encontrado anticuerpos anti-pilus en el suero de hospederos infectados con una variedad de bacterias, como en el caso de *Burkholderia mallei* (Fernandes *et al.*, 2007), *P. aeruginosa*, *V. cholerae* (Patel, 1991) y *Clostridium difficile* (Maldarelli *et al.*, 2014), entre otras. Así, los componentes más empleados son aquellos más expuestos, como la proteína formadora del pilus (PilA) o los pseudo-pilus. Adicionalmente, existen varias patentes que ilustran metodologías para generar aislados de pili purificado a partir de los cuales generar una respuesta en el sistema inmune con posible aplicación terapéutica (Donnenberg, 2013; Bakaletz, 2016; Brinton, 1983, 1988). Sin embargo, no hay estudios

en relación a la modulación de la respuesta inmune del hospedero generada por el pilus de *P. salmonis* o alguno de sus componentes.

## **2.6. Motivación del trabajo**

Teniendo en consideración que: i) la presencia de pili tipo IV en gran variedad de bacterias Gram-negativas, ii) la importancia del pili tipo IV en los procesos de adhesión e invasión del hospedero por parte de bacterias Gram-negativas, iii) la presencia de varios genes que codifican para proteínas del sistema de pili tipo IV en los genomas publicados de *P. salmonis* y, iv) potenciales proteínas del complejo que conforma la biogénesis del pili de *P. salmonis* contienen estructuras y motivos conservados descritos anteriormente, hacen necesario un análisis sobre el pilus de tipo IV en *P. salmonis*, tomando en cuenta el contexto actual en una industria, donde el uso de antibióticos y la falta de vacunas efectivas contra la Piscirickettsiosis pone en riesgo la actividad. En base a los antecedentes presentados, el pilus de tipo IV se muestra como una alternativa interesante de estudiar para el futuro desarrollo de aditivos para la formulación de nuevas herramientas biotecnológicas contra la Piscirickettsiosis.

## 2.7. Hipótesis

*Piscirickettsia salmonis* posee los componentes genómicos y proteómicos necesarios para la generación de una estructura pilus tipo IV en su superficie.

### 2.7.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar los componentes del pilus tipo IV de *P. salmonis* mediante estrategias genómicas y proteómicas.

### 2.7.2. Objetivos específicos

1. Identificar y caracterizar los componentes de la maquinaria de biogénesis del pilus de tipo IV en de *P. salmonis* LF89 mediante análisis de secuencia de genes y proteínas putativas.
2. Evaluar la expresión de componentes claves de la maquinaria del pilus tipo IV de *P. salmonis* a nivel de transcritos durante infección *in vitro*.
3. Identificar la proteína principal del pilus tipo IV de *P. salmonis* y analizar su secuencia por motivos relevantes.
4. Caracterizar morfológicamente por microscopía el pilus de tipo IV de *P. salmonis*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Material biológico

Células SHK-1 (Riñón anterior de salmón del Atlántico), cedidas generosamente del laboratorio del Dr. Álex Romero.

*Piscirickettsia salmonis* LF-89, proveniente del cepario del Instituto de Bioquímica y Microbiología de la Universidad Austral de Chile.

##### 3.1.2. Reactivos

<b>Merck</b>	Metanol, cloroformo, N, N,N',N'-tetrametiletildiamina (Temed), dimetil sulfóxido (DMSO), hidróxido de sodio, isopropanol, etanol absoluto, ácido fórmico, ácido acético, fosfato monoácido de sodio, glicerol, cloruro de guanidino, 2-yodoacetamida, carbonato de amonio pH 7.5, acetonitrilo, molibdato de amonio.
<b>Invitrogen</b>	Fenol saturado, desoxinucleótidos (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), Taq ADN polimerasa, TRizol®, acrilamida 30%, bisacrilamida (N,N'metilenbisacrilamida), SYBR® Safe DNA gel stain, suero bovino fetal, RNaseOUT 40U/μL

<b>Winkler</b>	Albumina de Suero Bovino, Azul de bromofenol, Azul de Coomassie, Sacarosa, Tween-20, Agarosa grado biología molecular
<b>Sigma-Aldrich</b>	SDS, Persulfato de amonio, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), Tris (Trizma base), EDTA, RNAsa A, Tritón X-100, DTT
<b>Stratagene</b>	Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix.
<b>Thermo</b>	Membranas nitrocelulosa
<b>Promega</b>	RNasin®, DNA polimerasa, Transcriptasa reversa (RT M-MLV), Oligo dT, Random Primers, Go taq® Green Master Mix, Anti IgG de ratón unido a peroxidasa, Tripsina
<b>Gibco</b>	Medio L-15 suplementado con SFB al 10%, 2-mercaptoetanol
<b>HyClone</b>	L-glutamina
<b>Epicenter</b>	ADNasa
<b>Michrom</b>	Magic C18 Particles
<b>Bioresources</b>	
<b>AgarScientific</b>	Grillas de Formvar

### 3.1.3. Soluciones

**PBS:** NaCl 136.89 mM, KCl 2.68 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10.14 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.76 mM, pH 7.4.

**Solución de bloqueo para Western blot:** PBS 1X; BSA 1%, Tween-20 0.3%.

**Solución de revelado:** DAB 0.2% (p/v) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.007% (v/v) en PBS.

**Solución de tñido para geles de poliacrilamida:** Azul de Coomassie R-250 0.3%, Metanol 50%, Ácido Acético 10%.

**Tampón de corrida SDS-PAGE:** 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0,1% SDS; pH 8,3.

**Tampón gel espaciador SDS-PAGE:** Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 04% SDS.

**Tampón gel separador SDS-PAGE:** Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; 0,4% SDS.

**Tampón de muestra 5X:** 200mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 10mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 20% glicerol, 0.05% azul de bromofenol.

**Tampón de transferencia SDS-PAGE:** 25 mM Tris, Glicina 193 mM, 0,1 % SDS, 20% Metanol.

**TBS:** Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.1 M, pH 7.4.

**TBST:** TBS, 0.5% Tween 20.

**Buffer RIPA:** Tris-HCl 50mM; NaCl 150mM; NP-40 1%, desoxicolato de socio 0,5%; SDS 1%; pH 7,5

#### 3.1.4. Kits

<b>Macherey-Nagel</b>	Kit de extracción de DNA NucleoSpin®
<b>Axygen</b>	Total RNA Extraction Kit
<b>Pierce</b>	Pierce™ BCA Protein Assay Kit

### 3.1.5. Equipos

Balanza RADWAG (WTB 200) y (AS310/C/12), Autoclave (QUIMIS) y horno pasteur (QUIMIS), Microcentrífuga (Heraeus Sepatech, Biofuge A), Refrigerador (Daewoo Electronycs), Congelador -80°C (Thermo Forma), Cámara de flujo laminar (Purifier Class II total exhaust, LABCONCO), pHmeter InoLab, Cámaras de electroforesis BIO-RAD WIDE MINI SUB CELL, Trans- iluminador UV (VILBER LOUMART), Termociclador Genemate® T960 Touch Cyler (Hangzhou Jingle Scientific Instrument Co., Ltd), Equipo de qPCR Mx3000P® (Stratagene), Gabinete de seguridad biológica clase II (LabGard), Sistema de documentación de imágenes para fluorescencia y quimioluminiscencia G: BOX (Syngene), Lector de placas Synergy 2 (Biotek), Gabinete para PCR aura (BIOAIR), Equipo NanoDrop®, Micropipetas Corning y Labnet, Concentrador Centrивap (Labconco), Columna trampa para péptidos trifásica de sílica de 350µm, NanoLC (ThermoFinnigan), LTQ Velos PRO (ThermoScientific), Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1320 (80kV), Cámara ORCA-HR (Hamamatsu).

### 3.1.6. Software

SigmaPlot 11.0, CLC Sequence Viewer v7.8, Amplifx v1.7, Xcalibur, Sequest (v 2.1), Herramientas bioinformáticas (BLASTx, PRIMER-BLAST, MatGat, SignalP, PSortB, TMPRed, InterProScan 5, I-TASSER, SWISS-MODEL, Dali).

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Condiciones de cultivo**

Para la determinación de componentes presentes de pili tipo IV, *P. salmonis* cepa LF-89 fue crecida en medio AUSTRAL-SRS a 18°C por 4 días en agitación constante (50rpm) hasta alcanzar la fase logarítmica (Yáñez *et al.*, 2014).

### **3.2.2. Análisis *in silico* de pili tipo IV de *P. salmonis***

La secuencia anotada de *P. salmonis* cepa LF-89 se obtuvo desde la base de datos de NCBI. Además, secuencias desde otros organismos se utilizaron para los análisis comparativos. Genes putativos involucrados en la biogénesis y función del pili tipo IV ausentes en la anotación inicial fueron identificados por homología mediante la herramienta BLASTx (versión 2.5.0) contra una base de datos de proteínas no redundantes pertenecientes a gamaproteobacterias. El alineamiento múltiple de secuencias se llevó a cabo con la herramienta ClustalW, incluida como un módulo dentro del software CLC Sequence Viewer (versión 7.8). Los cálculos de similitud entre secuencias se realizaron con la herramienta MatGAT (versión 2.0.2) (Campanella *et al.*, 2003).

En el caso de genes putativos que no pudieron ser identificados por homología a nivel de secuencia, pero que presentaban similitudes en la organización génica (sintenia) respecto a otras proteobacterias gamma (*P. aeruginosa* cepa PAO1 y *F. tularensis* cepa Schu S4), se identificaron por homología estructural a partir de la secuencia aminoacídica

de cada proteína hipotética empleando la herramienta SWISS-MODEL (Schwede *et al.*, 2003).

Cada producto génico predicho involucrado en la biogénesis y función del pili tipo IV de *P. salmonis* fue analizado con varias herramientas bioinformáticas para obtener información adicional acerca de su localización subcelular y función. Se realizaron predicciones de péptido señal con SignalP versión 4.1 (Petersen *et al.*, 2011), segmentos transmembrana y su orientación mediante TMpred (Hofmann y Stoffel, 1993), localización subcelular a través de la herramienta PSORTb versión 3.0.2 (Yu *et al.*, 2010) y por último una búsqueda de motivos moleculares conservados mediante InterProScan 5 (Quevillon *et al.*, 2005).

Adicionalmente, se generó un modelo 3D de la estructura de la proteína putativa Pila usando el servidor I-TASSER (Yang *et al.*, 2015), y el modelo obtenido fue comparado y estructuralmente alineado con las estructuras cristalinas presentes en el servidor PDB mediante el servidor Dali (Holm y Rosenström, 2010).

### **3.2.3. Diseño de partidores**

Se diseñaron sets de partidores de PCR para todos los elementos de pili tipo IV identificados en los genomas de *P. salmonis*, con una longitud cercana a cada gen completo (Tabla II). Además, se diseñó un segundo set de partidores para qRT-PCR de algunos genes de pili considerados como relevantes (Tabla III). Esto se hizo empleando el software AmplifX (versión 1.7.0) y su especificidad fue comprobada mediante Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012).

**Tabla II.** Partidores usados para PCR convencional.

Gen	Partidor	Secuencia (5' → 3')	Amplicón (bp)
<i>pilA</i>	<i>pilA1-F</i>	AAA ACC GCA ACC AGC TTG GCT TCT	402
	<i>pilA1-R</i>	CGT TTT GAA AGT CTC CCC AGG TGA	
<i>pilB</i>	<i>pilB1-F</i>	ACA CCA TAG ATC TTG GCC CAG T	1366
	<i>pilB1-R</i>	CTT GCC AGC GAT AGA GCT TTA C	
<i>pilC</i>	<i>pilC-F</i>	GGT CAC TGA CAG TCA ACA AAC CCA	562
	<i>pilC-R</i>	CGG GGT GTT GAG TGC TGC ATA AA	
<i>pilD</i>	<i>pilD2-F</i>	CCA TAC TAC TCA GCC TTG CG	660
	<i>pilD2-R</i>	AAC ATA ATA CAG CTA GGC TTA AA	
<i>pilF</i>	<i>pilF-F</i>	CGC GTC GTT GTC TTG CTT TA	710
	<i>pilF-R</i>	TGG CTG ATC AGA CCC AGA CTT	
<i>pilQ</i>	<i>pilQ-F</i>	ATA AAC GCA GTG CAC CGG AGT A	1216
	<i>pilQ-R</i>	AGG TGC TTT GAC TGC GAC TTT G	
<i>pilT</i>	<i>pilT-F</i>	CAG GTA GCC AAG TTG TTG CTG AAG	922
	<i>pilT-R</i>	TAA AGG CCG ACC ATG ACT GT	
<i>pilZ</i>	<i>pilZ-F</i>	CAA AGG TTG GCG CGG GTA T	265
	<i>pilZ-R</i>	TAC CAG CTG AAC CAA TCA ACT G	
<i>fimV</i>	<i>fimV-F</i>	CGC TAC CTT TCT AAC GTC CTG T	1263
	<i>fimV-R</i>	GTC CAT CGG TGA GCT TTC GGT ATT	
<i>fimT</i>	<i>fimT1-F</i>	CAA GAC CTA AGG AAA AGT CAT GAG	536
	<i>fimT1-R</i>	ACT TGC CTT GAG CAT TTT AGC	

**Tabla III.** Partidores usados para análisis de RT-qPCR.

Gen	Nombre partidor	Secuencia (5' → 3')	Amplicón (pb)
<i>pilA</i>	<i>pilA</i> _rt-F	CCG TGC CAA GCT ACC AAG AAT	171
	<i>pilA</i> _rt-R	GTG GGG CTG GGA AGT GGT ATT T	
<i>pilB</i>	<i>pilB</i> _rt-F	ACC GCA TAC GTC TAC GCA TTG A	147
	<i>pilB</i> _rt-R	AGT GAA AAC GGC CAT CTT GAG G	
<i>pilD</i>	<i>pilD</i> _rt-F	CGC TAC TTT GGC TCG GCT TAT T	156
	<i>pilD</i> _rt-R	CAC CTC CAA GAC CCT GTT TGT T	
<i>pilQ</i>	<i>pilQ</i> _rt-F	GCA GCT TAT TGC TGA ATT TGC TC	154
	<i>pilQ</i> _rt-R	TAT ATT GCC CTG CCT GCT CT	

### 3.2.4. Extracción de ADN y detección de genes de pili tipo IV por PCR

Se extrajo ADN genómico a partir de 1mL de cultivo bacteriano obtenido en las condiciones descritas anteriormente. Para esto, las bacterias fueron colectadas por centrifugación a 10000xg por 10 minutos, y la extracción se realizó empleando el Kit Nucleospin® Tissue (Macherey-Nagel, Alemania) de acuerdo con los protocolos del fabricante.

Las reacciones de PCR se realizaron en un equipo *Genemate® T960 Touch Cycler* (Hangzhou Jingle Scientific Instrument Co., Ltd, China) con el siguiente perfil térmico: Un ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95° por 20 segundos, 58°C por 20 segundos y 72° por 20 segundos; y un ciclo final de extensión de 5 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5% teñido con *Sybr Safe®* (Invitrogen). Las imágenes fueron capturadas en un equipo Syngene G:box (Syngene, EEUU).

### 3.2.5. Ensayo de infección celular

Para este estudio se empleó una línea celular de riñón anterior de salmón del Atlántico (*Salmon head kidney*, SHK-1) con alrededor de 30~40 pasajes. Las células fueron cultivadas en botellas de cultivo de 75cm<sup>2</sup>, en medio L-15 (Leibowitz) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Gibco, BRL), L-glutamina 6mM (HyClone Laboratories Inc, UT) y 2-mercaptoetanol a una concentración de 40µM (Gibco, Invitrogen Laboratories, Grand Island, NY). Para los experimentos de infección, células SHK-1 fueron sembradas (2x10<sup>5</sup> células por pocillo) en placas de 6 pocillos con medio L-15 suplementado con SFB al 10%. Las células fueron cultivadas por 4 días hasta alcanzar

80~90% de confluencia. Luego, monocapas de células fueron infectadas con *P. salmonis* cepa LF-89 en fase de crecimiento exponencial a una multiplicidad de infección (MOI) de 10 en medio L-15 suplementado con SFB al 2%. Posteriormente, las células se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) 0,01M a un pH de 7,4 y procesadas para aislamiento de ARN total en diferentes tiempos post-infección (0h, 4h, 8h, 16h, 24h, 2 días, 4 días y 6 días) usando el reactivo TRIzol (Ambion) y un kit comercial (Axygen).

### **3.2.6. Extracción de ARN**

Tras el ensayo de infección, y en cada uno de los tiempos trabajados (0h, 4h, 8h, 16h, 24horas, 2d, 4d y 6 días), se extrajo ARN de células infectadas desde cada muestra usando 1000µL de reactivo TRIzol (Ambion). Luego, se añadió 200µL de cloroformo, la solución fue agitada mediante vortex por 15 segundos y centrifugada a 12000xg por 10 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se mezcló con 500µL de isopropanol y se incubó a -20°C toda la noche. El ARN total fue extraído usando el kit Total RNA Extraction Kit (Axygen). Para evitar contaminación por ADN, 5µg de ARN total desde cada muestra fue incubado a 37°C por 10 minutos con ADNasa (Epicenter) hasta un volumen final de 60µL.

### **3.2.7. Síntesis de ADNc**

Para síntesis de ADNc, ARN de cada muestra fue tratado con transcriptasa reversa (M-MLV Reverse Transcriptase, Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, una solución compuesta por 1µg de ARN, mix de "random

primers” a concentración de 1nM y oligo(dT) (desde 15 a 27 pares de bases) se incubó a 70°C por 5 minutos. Después, se añadió una segunda solución conteniendo 5µL de buffer RT 5x, 1,25µL de dNTPs 10mM y 1µL de RNaseOUT 40U/µL (Invitrogen), y se ajustó con agua libre de nucleasas para un volumen final de 25µL. Finalmente, la solución fue incubada por 60 minutos a 37°C.

### 3.2.8. PCR cuantitativo (qPCR)

Para la reacción de qPCR fue realizada en el equipo Mx3000 (Stratagene) utilizando 1µL de ADNc de cada muestra. El perfil de la reacción fue el siguiente: Una ronda de denaturación inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, hibridación a 58°C por 20 segundos y extensión a 72°C; y un ciclo final de extensión a 72°C por 4 minutos. Se empleó el reactivo Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent) y se determinó una curva de melting de 50°C hasta 65°C para evaluar la especificidad de los partidores utilizados.

Para la normalización de la expresión génica, se emplearon partidores de los genes constitutivamente expresados (*housekeeping*) *rpoD*, *gapdh* y 23S ARNr de *P. salmonis* LF-89 (Tabla IV). Se cuantificó la expresión relativa mediante el método comparativo Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Pfaffl, 2001), utilizando la expresión a 0 horas (inicial) como calibrador. Los experimentos se realizaron dos veces en triplicado.

**Tabla IV.** Primers usados para la normalización de la expresión relativa de genes de pili tipo IV mediante RT-qPCR.

Gen	Nombre "primer"	Secuencia (5' → 3')	Amplicón (pb)
23S	23S-F	GATGAAACAAGAGTAGGTCGGG	131
	23S-R	TTTAGCCTTGGAGGATGGTC	
<i>rpoD</i>	RpoDf1	TTGAAAACCGGTGTTGAGAT	178
	RpoDr1	CTCTAACTGCCAAGGCATCC	
<i>gapdh</i>	GAPDH/Ps/Fwd2	AAGTTTGCCTTGGGACACGA	103
	GAPDH/Ps/Rev2	TTTAGCACCGGCAGTGATGT	

### 3.2.9. Preparación del extracto proteico

El extracto de proteínas totales fue preparado de acuerdo con Oliver *et al.* (2015) con algunas modificaciones. Brevemente, se colectan las bacterias crecidas en medio líquido mediante centrifugación a 5000g por 10 minutos a 4°C como se describió anteriormente. Luego, las bacterias fueron resuspendidas en 500µL de buffer RIPA (Tris-HCl 50mM; NaCl 150mM; NP-40 1%, desoxicolato de sodio 0,5%; SDS 1%; pH 7,5) con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1X e incubado en hielo por 30 minutos. Luego, las bacterias fueron sonicadas a 80 Watts por 2 minutos con pulsos cada 20 segundos. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 16000xg por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante, que contiene el extracto total de proteínas, fue colectado, alicuotado y guardado a -80°C hasta su uso. Para cuantificar el extracto proteico de *P. salmonis*, se usó el kit comercial Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Pierce), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE. Para los ensayos de espectrometría de masas, los extractos fueron liofilizados para su preservación.

### 3.2.10. Lisis de muestras proteicas para espectrometría de masas

Las muestras de extractos proteicos previamente liofilizadas fueron resuspendidas en cloruro de guanidinio 6M, NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25mM (pH 7,5), reducidas con ditriotreitol (DTT) 2mM por 30 minutos a temperatura ambiente y alquiladas con 2-yodoacetamida 10mM por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción fue diluida 7 veces con NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> pH 7,5 y se añadieron 2µL de tripsina modificada (Promega) a una

concentración de 0,1ng/mL. La reacción de tripsina fue incubada por 16 horas a 37°C. La reacción fue terminada por adición de ácido acético (pH 2,0).

### **3.2.11. Análisis de identificación proteica**

Después de la lisis, las muestras fueron concentradas en un equipo Centrivap (Labconco) a un volumen final de 20  $\mu$ L y cargadas en una columna trampa para péptidos trifásica de sílica para HPLC de 350  $\mu$ m llenada con: a) 3 cm de C18 de fase reversa para quitar las sales (100Å, 5 $\mu$ m, Magic C18 Particles, Michrom Bioresources), b) 3 cm de una columna de intercambio catiónico (300Å, 5 $\mu$ m PolySULFOETHYL A, PolyC Inc.) y c) 3 cm de C18 de fase reversa como fase resolutive. Esta trampa de péptidos se montó en el bucle de un nanoLC (ThermoFinnigan).

Tras un lavado con ácido fórmico 0,1% por 30 minutos a un flujo de 0,5 $\mu$ L/minuto, el eflujo de la columna trampa de péptidos se llevó a una columna resolutive de fase reversa de 10cm (100Å, 5 $\mu$ m, Magic C18 particles, Michrom Bioresources), montada en la fase de electrospray de un espectrómetro de masas LTQ Velos PRO (ThermoScientific).

Los péptidos fueron separados en un gradiente de acetonitrilo de 0-90% por 280 minutos a través de un flujo de 350nL/min. Se usó un voltaje de 1,9kV para el electrospray, con 250°C de temperatura para la transferencia de iones. El espectrómetro de masas fue controlado con el software Xcalibur para hacer análisis de escaneo de masas continuo en la FT (transformada de Fourier) seguido de escaneos de MS/MS en la trampa de iones para los 12 iones de mayor intensidad, con exclusión dinámica de los

escaneos repetidos del mismo ión, con repeticiones de 30 segundos y una exclusión de 90 segundos. La energía de colisión normalizada para MS/MS se estableció en 35%.

### **3.2.12. Análisis de datos MS/MS**

Todas las muestras de espectros de tándem MS/MS obtenidas se analizaron empleando el software Sequest (v2.1; Thermo Fisher Scientific). Sequest fue configurado para buscar “*uniprot Piscirickettsia+salmonis.fasta*” (10,012 entradas) asumiendo el uso de tripsina como enzima de digestión. Se buscó en Sequest usando una tolerancia de masa iónica de fragmento de 0,8 Da y una tolerancia de ión parental de 50PPM.

La carbamido-metilación de cisteína, deamidación de asparagina/glutamina, y la oxidación de la metionina fueron especificadas en Sequest como modificaciones posibles.

### **3.2.13. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

La identificación del pili tipo IV fue llevada a cabo mediante tinción negativa y analizada por microscopía electrónica de transmisión de acuerdo con Oliver et al. (2016). Para la tinción negativa, bacterias crecidas en el medio AUSTRAL-SRS lavadas con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo e interferentes como restos celulares, y posteriormente resuspendidas en agua deionizada y ubicadas en la superficie de grillas de cobre cubiertas con carbón y Formvar por 5 minutos. Tras remover el exceso de líquido de la superficie de las grillas con un trozo triangular de papel filtro, se dejaron flotando en

gotas de una solución saturada de molibdato de amonio por 20-30 segundos. Luego las grillas fueron secadas por aire y las muestras se visualizaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1320 y 80kV. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Hamamatsu ORCA-HR.

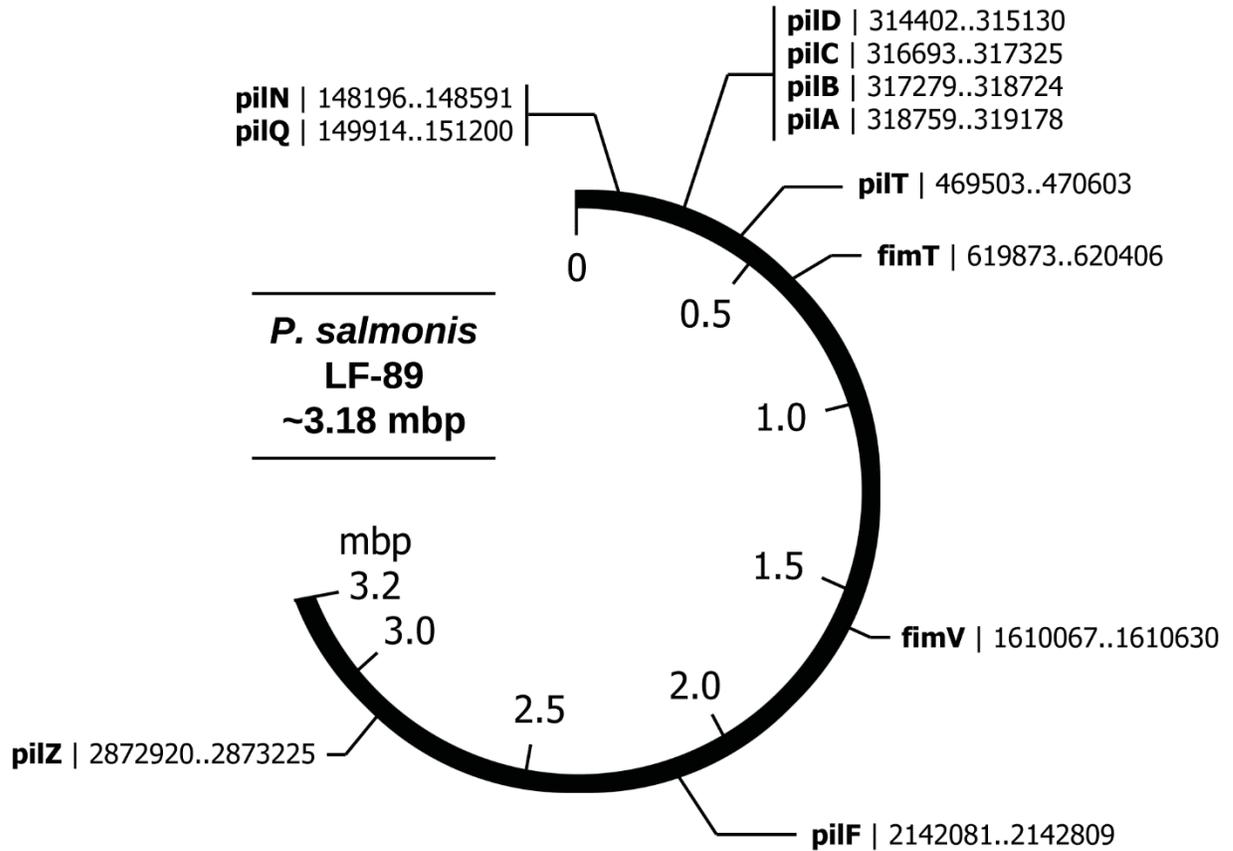
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificación *in silico* y caracterización de genes putativos de pili tipo IV en *P. salmonis*.

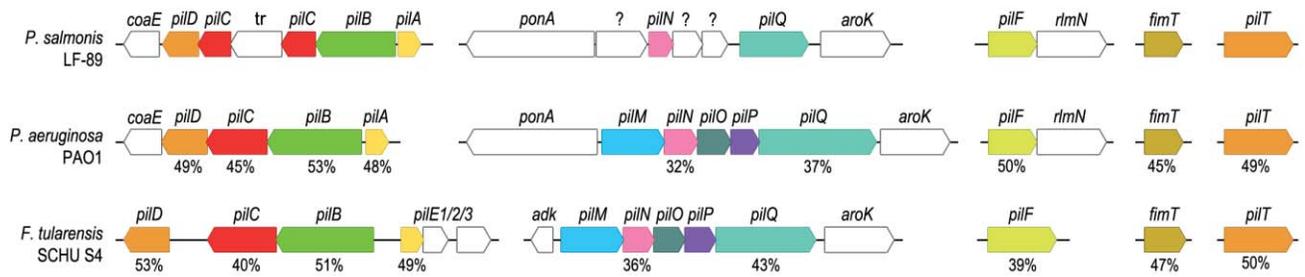
Los genes identificados de pili tipo IV en *P. salmonis* cepa tipo LF-89 se distribuyen a lo largo de genoma de manera fragmentada en varios *loci*, como se observa en la Figura 3. Además, la Figura 4 muestra que varios de estos genes se encuentran localizados individualmente, mientras que los genes putativos de *pilA*, *pilB*, *pilC*, *pilD*, *pilM*, *pilN*, *pilO*, *pilP* y *pilQ* se encuentran organizados en clusters. Estos genes muestran niveles de identidad a nivel de secuencia relativamente altos con sus homólogos (entre un ~35 y ~50%) en gama-proteobacterias relacionadas como son *P. aeruginosa* cepa PAO1 y *F. tularensis* cepa SCHU S4). Adicionalmente, los genes de pili tipo IV fueron identificados por análisis de PCR, como se ve en la Figura 5. Para cada gen putativo analizado, el producto de PCR obtenido fue del tamaño esperado, según tabla II.

### 4.2. Expresión génica a nivel de transcrito de los genes de pili tipo IV durante una infección *in vitro*

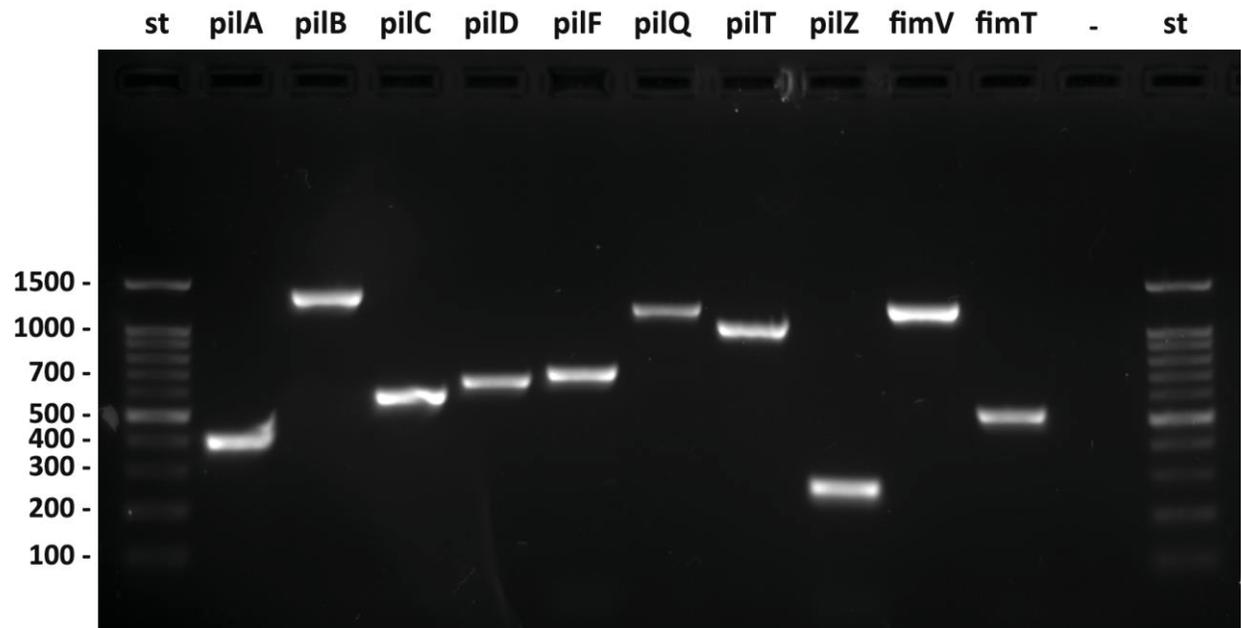
Con el fin de evaluar los niveles de transcritos de genes fundamentales para a biogénesis del pili tipo IV identificados previamente, se llevó a cabo la cuantificación relativa de transcritos durante una infección *in vitro* de células SHK-1, mediante RT-qPCR. Así, como se ve en la figura 6 los genes de pili tipo IV mostraron patrones de expresión diferenciado. Se observó que en general, el nivel de expresión de la mayoría



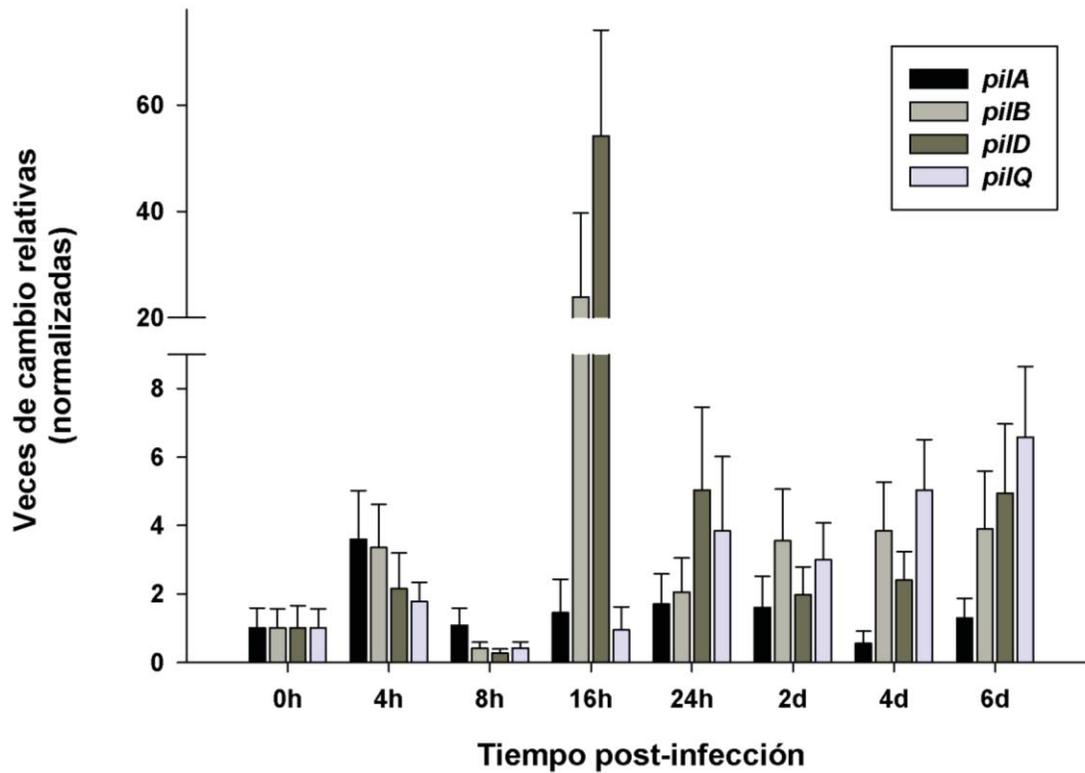
**Figura 3.** Organización y distribución de los genes hallados de pili tipo IV en el genoma de *P. salmonis* LF-89 (NZ\_CP011849.2).



**Figura 4.** Distribución y análisis comparativo de los genes de pili tipo IV en *P. aeruginosa* PAO1 (NC\_002516.2), *F. tularensis* SCHU S4 (NC\_006570.2) y *P. salmonis* LF-89 (NZ\_CP011849.2). Valores de similitud a nivel de secuencia obtenidas desde alineamientos pares con los genes homólogos de *P. salmonis* se indican bajo cada gen. La comparación de secuencias se hizo con la herramienta MatGat.



**Figura 5.** Amplificación por PCR de los genes del pili tipo IV en *P. salmonis* LF-89. Los carriles y tamaños esperados de amplicón entre paréntesis son: 100 bp DNA ladder, y luego genes de pili tipo IV – *pilA* (402 pb), *pilB* (1366 pb), *pilC* (562 pb), *pilD* (660 pb), *pilF* (710 pb), *pilQ* (1216 pb), *pilT* (922 pb), *pilZ* (265 pb), *fimV* (1263 pb), *fimT* (536 pb).



**Figura 6. Niveles de transcrito de genes de pili tipo IV en una cinética de infección *in vitro*.** Los niveles de transcrito se normalizaron contra la expresión génica de *rpoD*, *gapdh* y 23S ARNr en *P. salmonis* LF-89. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos realizados en triplicado.

de los genes estudiados sufre una disminución 8 horas post-infección, para luego aumentar a las 16 horas post-infección. En el caso específico del gen *pilA*, éste muestra un máximo de expresión a tiempo muy temprano (a las 4 horas post-infección) para luego disminuir su expresión en etapas tardías de la misma. Por el contrario, el gen *pilQ*, tiene un patrón opuesto, es decir, presenta un nivel de expresión relativamente bajo en las primeras etapas de la infección para luego aumentar fuertemente sus niveles de transcrito a los 4 y 6 días post-infección. Por otra parte, los genes *pilB* y *pilD* aumentan significativamente a las 16 horas post-infección. Estos resultados sugieren que los genes de pili tipo IV se transcriben activamente y de manera diferencial durante un proceso infeccioso de *P. salmonis*.

#### **4.3. Análisis de proteínas putativas codificadas por genes de pili tipo IV de *P. salmonis***

En la Tabla V, se muestran resultados del análisis con herramientas bioinformáticas con capacidad de predecir características relevantes a partir de la secuencia de los productos putativos de los genes de pili tipo IV identificados en *P. salmonis* LF-89 (SignalP – presencia de péptido señal; TMPred – presencia de dominios de transmembrana; PSortB – estimación de la localización subcelular; e InterProScan – búsqueda de dominios proteicos funcionales conservados). En la mayoría de los casos, las secuencias putativas contenían motivos moleculares que entregan pistas sobre sus probables funciones y localización. Sólo las proteínas PilA, PilD y PilF fueron predichas como poseedoras de péptido señal.

**Tabla V.** Propiedades de genes/proteínas putativas de *P. salmonis* LF-89.

Gen	Tamaño (pb)	Péptido señal <sup>a</sup>	Dominio TM <sup>b</sup>	Localización <sup>c</sup>	Motivos conservados <sup>d</sup>
<i>pilA</i>	420	No	1	Unknown	General secretion pathway protein G, pilin subunits, prokaryotic N-terminal methylation site
<i>pilB</i>	1446	No	0	Cytoplasmic	Pfam 00437 - Type II secretion system protein E, GO:0005524 - ATP binding
<i>pilC_1</i>	633	No	1	Cytoplasmic membrane	GspF/PilC family, GO:0009306 - protein secretion
<i>pilC_2</i>	543	No	2	Cytoplasmic membrane	Type II secretion system F domain
<i>pilD</i>	729	Yes	6	Cytoplasmic membrane	IPR014032, Pfam 01478 - Peptidase A24A, prepilin type IV - bacterial,
<i>pilF</i>	729	Yes	1	Outer membrane	Family IPR013360 - Pilus biogenesis/stability type IV, PilW
<i>pilQ</i>	1286	No	1	Outer membrane	GspD/PilQ family, type IV pilus secretin PilQ, GO:0009297 pilus

					assembly, GO:0009306 protein secretion
<i>pilT</i>	1101	No	1	Cytoplasmic	Type II secretion system protein E, GO:0005524 - ATP binding, PTHR30486: Twitching motility protein PilT
<i>pilZ</i>	306	No	0	Unknown	C-di-GMP binding
<i>fimT</i>	564	No	1	Unknown	LysM domain, Motility protein FimV, N-terminal
<i>fimV</i>	1326	No	2	Cytoplasmic membrane	TIGR03505 - Motility protein FimV, N-terminal
<i>pilM</i>	876	No	1	Cytoplasmic	None
<i>pilN</i>	396	No	0	Unknown	None
<i>pilO</i>	534	No	3	Unknown	None
<i>pilP</i>	402	No	2	Cytoplasmic membrane	None

<sup>a</sup> Predicho usando el servidor para SignalP 4.1.

<sup>b</sup> Predicho usando el servidor TMPred.

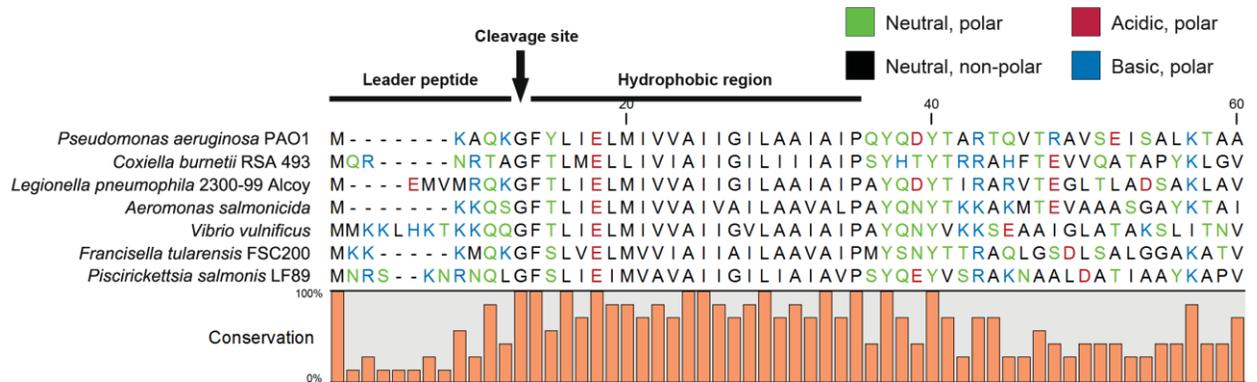
<sup>c</sup> Predicho usando la herramienta PSortB.

<sup>d</sup> Secuencias escaneadas contra la base de datos InterPro.

Un análisis comparativo de la región N-terminal de la putativa proteína PilA de *P. salmonis* con las secuencias de otras *gamaproteobacterias* con pilus de tipo IV cuya funcionalidad ha sido probada empíricamente (Figura 7), muestra un alto nivel de conservación a nivel de secuencia. Además, varias características relevantes para la biogénesis y función del pilus se encuentran conservados como, por ejemplo, un péptido corto al inicio con residuos polares, un sitio de clivaje tras una glicina y cinco residuos río abajo, un residuo de ácido glutámico conservado que es sucedido por una región altamente hidrófoba. Al mismo tiempo, el modelo tridimensional resultante para la proteína PilA (Figura 8), posee una arquitectura extremadamente similar con aquellas de bacterias filogenéticamente cercanas, consistente en una  $\alpha$ -hélice N-terminal que protruye del resto de la estructura proteica y una región C-terminal de forma globular que está envuelta por varias hojas beta. Esta estructura (con un score TM de 0,62 – alto) al ser comparada por homología estructural en el servidor Dali arroja que la estructura más semejante entre las albergadas en la base de datos de estructuras PDB es PilA de *P. aeruginosa* cepa PAK (PDB: 1oqw) con un RMSD (*Root mean square deviation*) de 1,8Å, considerado como una aproximación adecuada de la semejanza de ambas estructuras.

#### **4.4. Análisis proteómico de pili tipo IV e identificación de PilA**

Con el propósito de evaluar la presencia proteínas fundamentales para la biogénesis del pili tipo IV de *P. salmonis*, un foco importante de este estudio fue identificar la proteína estructural del pilus. Así, mediante análisis de espectrometría de masas



**Figura 7.** Alineamiento múltiple de la región conservada N-terminal de la proteína putativa Pila de *P. salmonis* (ALA23780.1) con bacterias filogenéticamente relacionadas: *F. tularensis* SCHU S4 (YP\_169887.1), *P. aeruginosa* PAO1 (AAK68046.1), *C. burnetii* RSA493 (NP\_819206.1), *L. pneumophila* 2300-99 (ADG25256.1), *A. salmonicida* (WP\_058394587.1) and *V. vulnificus* (ACK37854.1).

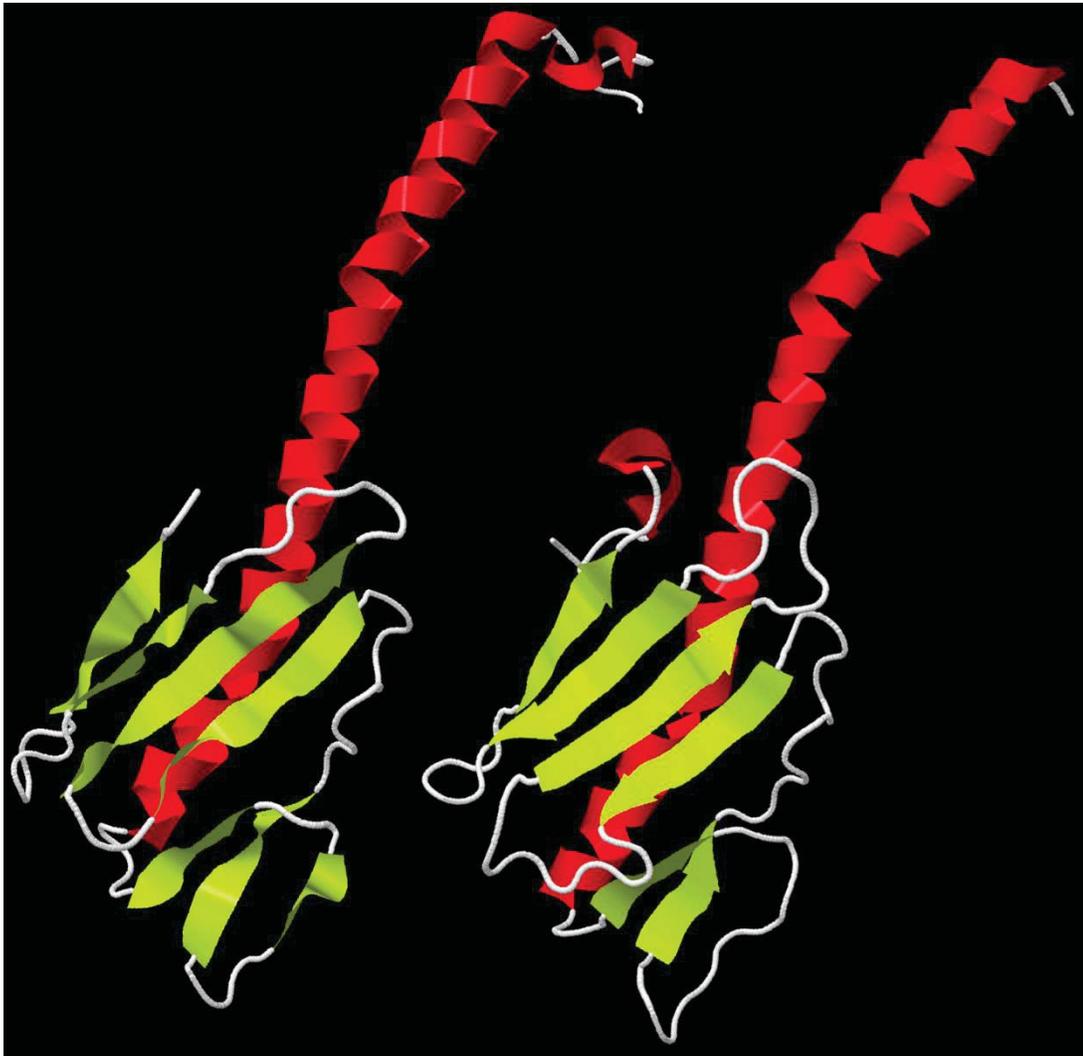


Figura 8. Estructura predicha para la proteína PilA de *P. salmonis* (izquierda) y *P. aeruginosa* cepa PAK (PDB: 1oqw, derecha). Los colores denotan el tipo de estructura secundaria ( $\alpha$ -hélices en rojo, hojas- $\beta$  en amarillo y *coils* de color blanco). El modelo 3D fue obtenido a través del servidor I-TASSER (RMSD: 1,8Å).

(MudPit) desde extractos proteicos de *P. salmonis* cultivada en medio líquido, fue posible identificar la proteína PilA a partir de 4 péptidos únicos (indicados en la Tabla VI), que representan un 25,18% de cobertura en la secuencia aminoacídica total de PilA. La masa molecular calculada para PilA fue de 14.9kDa. Notablemente, varios de los péptidos identificados sufrieron modificaciones post-traduccionales como, por ejemplo, deamidaciones y oxidaciones (Tabla VII). Además, se identificaron otros componentes proteicos involucrados en la biosíntesis de pili tipo IV, como PilQ, PilC, PilW (PilF en otras nomenclaturas) y PilZ, lo cual sugiere que las proteínas que conforman la maquinaria de pili tipo IV se encuentran en la bacteria, ya sea en la membrana externa o en el periplasma.

#### **4.5. Identificación de estructuras tipo pili en la superficie de *P. salmonis*.**

Finalmente, como una manera de evaluar la presencia de estructuras filamentosas y/o la presencia de un pili tipo IV en la superficie de *P. salmonis*, se realizó tinción negativa de bacterias cultivadas en medio líquido y se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión. La observación de *P. salmonis* reveló en un número bajo de células la presencia de estructuras largas (<100 nm), flexibles y de orientación polar en la superficie de carbono (Figura 9). Estas estructuras, que poseen morfología de pili tipo IV poseen un diámetro de 5 a 6nm, se encontraron en solo una fracción de las bacterias. Estos datos sugieren la presencia de apéndices filamentosos de morfología similar a un pili de tipo IV en la superficie de *P. salmonis*.

**Tabla VI.** Proteínas involucradas en biogénesis y función del pili tipo IV de *P. salmonis* identificadas por análisis proteómico.

Acceso	Peso (kDa) <sup>a</sup>	Nombre en base de datos	Puntaje Sequest	Péptidos	Cobertura (%) <sup>b</sup>
ALA23780.1	14.9	Type IV pilus biogenesis protein PilA	4.11	8	25.18
ALA23777.1	46	Type IV pilus biogenesis protein PilC [ <i>P. salmonis</i> ]	2.13	1	4.7
APS48960.1	45.7	Pilus assembly protein PilQ [ <i>Piscirickettsia salmonis</i> ]	6.42	2	9
AKP73443.1	27.6	Pilus assembly protein PilW [ <i>P. salmonis</i> LF-89 = ATCC VR-1361]	16.3	2	10
ALY03133.1	23.6	Pilus assembly protein PilZ [ <i>Piscirickettsia salmonis</i> ]	10.44	2	4

<sup>a</sup> Peso molecular calculado para la proteína identificada.

<sup>b</sup> Cobertura de la secuencia proteica total que abarcan los péptidos.

**Tabla VII.** Péptidos identificados por análisis proteómico que coinciden con la secuencia de la proteína PilA de *P. salmonis* LF-89.

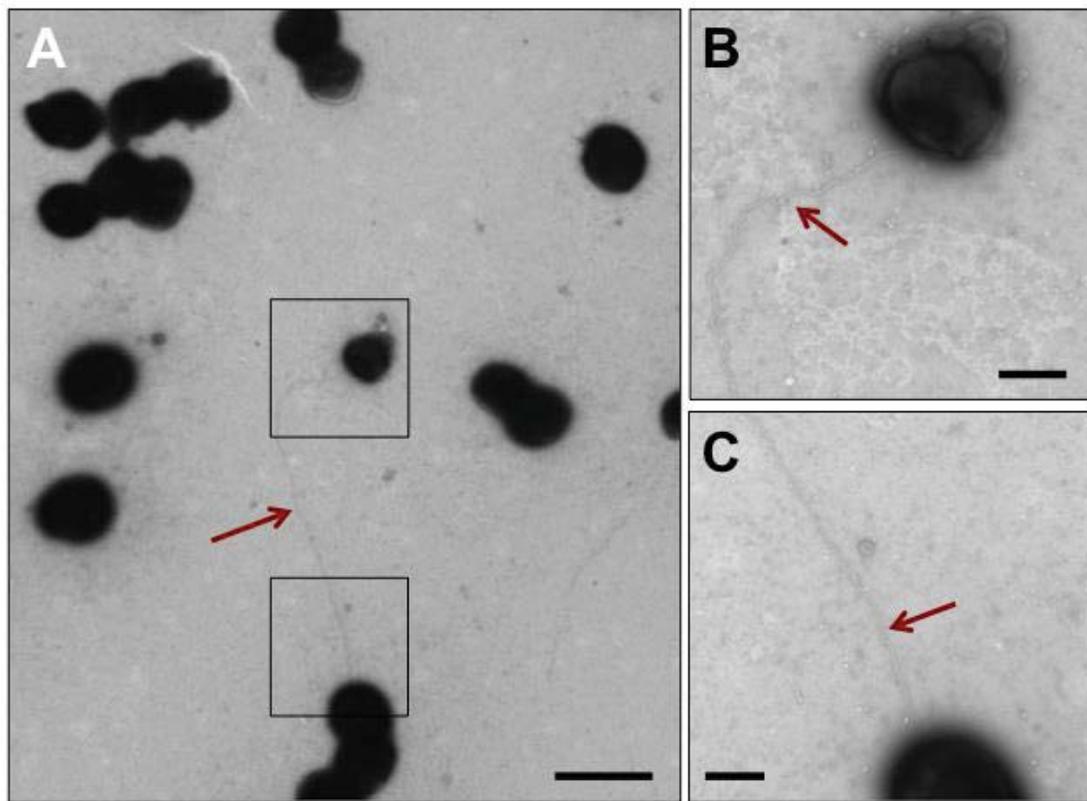
Secuencia péptido	XCorr <sup>a</sup>	Carga	m/z (Da) <sup>b</sup>	$\Delta M$ (ppm) <sup>c</sup>	RT (min) <sup>d</sup>
QTITIEAEDDSTGKSR	2.46	3	1752.00784	663.47	240.60
MNRSKNR	1.54	2	904.50013	-1076.07	53.27
nAALDATIAAYK	1.47	3	1222.49338	-112.94	57.07
mNRSKNR	1.45	2	921.50072	35.12	50.82
qTITIEAEDDSTGK	1.45	3	1508.25058	-295.53	66.86
NAALDATIAAYK	1.42	3	1222.99351	1100.64	47.30
qTITIEAEDDSTGKSR	1.37	3	1751.50783	-183.63	238.34
MnRSKNR	1.32	2	906.50024	47.19	54.23

<sup>a</sup> Puntaje de correlación de SEQUEST.

<sup>b</sup> Masa del precursor.

<sup>c</sup> Cambio en la masa del péptido observado a partir de la masa teórica en partes por millón.

<sup>d</sup> Tiempo de retención en minutos.



**Figura 9. Micrografía electrónica de estructuras tipo pili derivadas de *P. salmonis*.** Imagen tomada mediante microscopio electrónico de transmisión en cultivo de *P. salmonis* con tinción negativa. La barra representa 1 $\mu$ m. (B, C) Magnificación de estructuras tipo pilus en *P. salmonis*. Barra: 50nm

## 5. DISCUSIÓN

Durante la última década, *P. salmonis* ha alcanzado gran notoriedad entre los patógenos de salmónidos debido a su rol como agente etiológico de la Piscirickettsiosis. Esta patología causa enormes pérdidas a la industria chilena del salmón y constituye la principal causa de mortalidad secundaria en peces de cultivo (Sernapesca, 2017). Un atributo importante en las bacterias consideradas como patógenas es su capacidad para adherirse a la superficie de las células del hospedero. Para este propósito, una de las estrategias más empleadas es el uso de *pili*, los cuales son apéndices filamentosos que se extienden desde la membrana externa y se consideran un importante factor de virulencia (Hospenthal *et al.* 2017).

Entre los varios tipos de *pili* que se han descrito, los *pili* de tipo IV es el de mayor presencia entre filos bacterianos y ha sido ampliamente estudiado en varias bacterias Gram-negativas, sobretodo en *N. meningitidis* (Carbonnelle *et al.* 2006), *P. aeruginosa* (Alm y Mattick, 1997) y *V. cholerae* (Thelin y Taylor, 1996). También ha sido caracterizado en bacterias patógenas de especies marinas, como *Vibrio vulnificus* (Paranjpye y Strom, 2005), *Aeromonas salmonicida* (Masada *et al.* 2002) y *Vibrio anguillarum* (Frans *et al.* 2013), mediando variadas funciones, desde adhesión a superficies celulares y formación de biopelículas, hasta captación de DNA y motilidad “espásmica” (*twitching motility*) (Pelicic, 2008). Por otra parte, proteínas constituyentes de pilus han sido propuestos como parte de formulaciones de vacunas debido a sus interacciones con las células del huésped y su alta inmunogenicidad (Sharma *et al.*, 2011, Delany *et al.*, 2013).

A pesar de los importantes avances en el estudio de la función y estructura de los pili de tipo IV, el uso de diferentes nomenclaturas para los componentes del pili tipo IV entre patógenos aún es un problema (Craig y Li, 2008). En el presente estudio se identificaron componentes del pili tipo IV en *P. salmonis* cepa de referencia LF-89 usando la nomenclatura de *P. aeruginosa*, a menos que se haya indicado lo contrario. Así, el análisis genómico reveló la presencia de dos clusters principales de genes codificantes para putativos componentes de pili tipo IV. El cluster *pilABCD* incluye homólogos de los genes *pilD*, que codifica para una peptidasa que cliva el llamado péptido líder de la proteína prepilina, para generar la forma madura de la proteína PilA (Nunn y Lory, 1991); el gen *pilC*, que codifica para una proteína de membrana interna que funciona como una plataforma para la biogénesis del pili tipo IV (Strom y Lory, 1993); el gen *pilB*, el cual se traduce en una ATPasa, la cual mediante la hidrolización de ATP genera el impulso mecánico para la salida del pilus (Jakovljevic *et al.*, 2008); y el gen *pilA* que codifica para la subunidad principal del pilus, llamada pilina (Mattick, 2002). Por otra parte, el cluster *pilMNOPQ* contiene homólogos estructurales, pero con baja similitud en su secuencia, a los productos génicos putativos de *pilMNOP*, que han sido caracterizados en *P. aeruginosa* como partes de un complejo que provee estabilidad a la estructura del pili tipo IV en la membrana interna (Tammam *et al.*, 2013) y un homólogo del gen *pilQ*, el cual codifica para una secretina que forma un poro en la membrana externa y por lo tanto, es el punto de salida de las múltiples subunidades de pilina (Collins *et al.*, 2005).

Ciertos atributos, como la longitud del péptido inicial (o líder) de la proteína PilA, el cual contiene los residuos que preceden al sitio de clivaje conservado GFxxxE, y el ordenamiento de los genes putativos de pili tipo IV a lo largo del genoma han sido algunos

factores empleados para definir dos subtipos de pili tipo IV (Pelicic, 2008). De esta forma, los análisis realizados muestran que el péptido líder de la proteína PilA de *P. salmonis* LF-89 es corto, conformado por menos de 10 residuos, y la distribución de los genes de pili tipo IV, dispersos en pequeños clusters, define el pilus de *P. salmonis* como uno de subtipo TfpA, similar al pilus presente en gammaproteobacterias relacionadas, como *P. aeruginosa* (Weiss y Raj, 1972; Mattick, 2002) o *F. tularensis* (Salomonsson *et al.* 2011). Además, los genes de pili tipo IV de *P. salmonis* presentan una conservación de la sintenia observada a lo largo de varios filos bacterianos, incluso si son bacterias filogenéticamente distantes (Pelicic, 2008).

En este trabajo se definió un set de 15 genes putativos de pili tipo IV, incluyendo dos genes *fim\**. Sin embargo, la cantidad de proteínas involucradas en la biogénesis del pili tipo IV y la función que cada proteína realiza puede variar en cada especie modelo para la cual se ha realizado un análisis sistemático, ubicándose en el rango desde las 10 proteínas en el pili co-regulado por toxina (Tcp, *toxin co-regulated pilus*) de *V. cholerae* (Heidelberg *et al.*, 2000), el mismo número en *F. tularensis* (Salomonsson *et al.* 2011), 15 en *N. meningitidis* (Carbonnelle *et al.*, 2005), hasta más de 20 proteínas en especies del género *Xanthomonas* (Dunger *et al.*, 2016) y *P. aeruginosa* (Mattick, 2002).

Generalmente, la biogénesis del pilus involucra el procesamiento y traslocación a través de la membrana de una sola proteína llamada PilA, que constituye la subunidad mayor del pilus (Hospenthal *et al.*, 2017). Para conseguir esto, la “pre-pilina”, que posee un tipo de péptido señal en su zona N-terminal se inserta en la membrana interna de la bacteria en un proceso dependiente de la vía Sec. Posteriormente, este péptido señal es

clivado, dejando un residuo de fenilalanina expuesto, el cual es posteriormente metilado (Strom y Lory, 1991) en un proceso mediado por la peptidasa PilD (Nunn y Lory, 1991). La proteína pilina, ya en su estado maduro y localizada en la membrana interna se ubica en la maquinaria de pili tipo IV durante los procesos de ensamblaje y elongación, los cuales son generados por la ATPasa PilB y la proteína de plataforma PilC, la cual sirve de “domo” para ensamblar el resto de componentes. Estas proteínas forman el llamado subcomplejo motor (*‘motor subcomplex’*) (McCallum *et al.*, 2017; Hospenthal *et al.*, 2017). El ensamblaje y elongación del pilus se realiza a través del subcomplejo de secreción, compuesto de la proteína PilQ, que adopta una formación dodecamérica en la membrana externa para formar el poro a través del cual salen las pilinas ensambladas. Un tercer subcomplejo, compuesto por las proteínas PilM, PilN, PilO y PilP se une a los dos de forma dinámica, ayudando a los procesos de elongación y retracción (Tammam *et al.*, 2013).

Los componentes de la maquinaria del pili tipo IV mencionados hasta este punto se les considera como proteínas “*core*” debido a su relevancia en la biogénesis de pilus, estando presentes en un amplio rango de bacterias en las cuales se ha observado la presencia de un pili tipo IV funcional, y distinguirlos de aquellos componentes “no-core”, que se han hallado y caracterizado en menos especies y median un sinnúmero de funciones como: i) la estabilización de la estructura del pilus por los llamados ‘pilus menores’, proteínas que poseen péptidos señal similares a los de la subunidad mayor PilA pero con funcionalidad limitada (Brown *et al.*, 2010); ii) la regulación fina de la expresión del pilus, como en el caso del regulador transcripcional de dos componentes PilR-PilS (Boyd *et al.*, 1994; Kehl-Fie *et al.*, 2009); y iii) procesos como la retracción del

*pilus*, llevado a cabo por la ATPasa PilT (Jakovljevic *et al.*, 2008). Esto significa que solo una porción de proteínas de pili tipo IV se requieren para la biogénesis y en ensamble, algo que ha sido sugerido en estudios previos (Alm y Mattick, 1997; Carbonnelle *et al.*, 2006) y que ha sido refrendado por estudios recientes que han determinado una ‘maquinaria mínima’ formada por las proteínas PilD, PilE, PilF, PilG, PilM, PilN, PilO y PilP de *N. meningitidis*, capaz de ensamblar pili en el periplasma (Goosens *et al.*, 2017). En este aspecto, los componentes identificados en el genoma de *P. salmonis* LF-89 deberían ser, en teoría, suficientes para generar y ensamblar pili de tipo IV en el periplasma de la bacteria, de acuerdo con los realizados. Finalmente, el genoma de *P. salmonis* LF-89 también posee genes que codifican para PilF, una lipoproteína que promueve la polimerización de la secretina PilQ (Koo *et al.*, 2008); PilZ, proteína con dominios de unión al metabolito secundario c-di-GMP (Alm *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2010); y las proteínas *fim* FimV y FimT, asociadas con una regulación positiva del ensamble de pili y motilidad *twitching* (Alm y Mattick, 1996; Semmler *et al.*, 2000).

A nivel de transcritos, los niveles de genes claves de pili (*pilA*, *pilB*, *pilD* y *pilQ*) mostraron patrones únicos, con un *peak* de cantidad de transcritos a las 16 horas post-infección para *pilB* y *pilD*, lo cual es consistente con algunos reportes previos (Gil *et al.*, 2004; Waite *et al.*, 2005). Sin embargo, factores abióticos como la temperatura pueden afectar fuertemente los niveles de transcritos para genes de pili tipo IV, lo que genera resultados que difieren de los obtenidos en este estudio (Chan *et al.*, 2016; Mokrzan *et al.*, 2016), lo cual significa que la expresión de genes de pili tipo IV podría variar dependiendo de condiciones externas y/o ambientales. Además, estos resultados sugieren que mientras *pilA* se expresa de manera ubicua durante todos los tiempos post-

infección analizados, su procesamiento y ensamble son procesos que se realizan en fases posteriores, lo que se ve reflejado en la dinámica de transcripción de *pilB* y *pilD*.

La proteína putativa PilA identificada en *P. salmonis* contiene varias características en su zona N-terminal asociadas a subunidades de pili o a pilinas, como: i) una secuencia corta al inicio denominada como péptido líder, que lleva un péptido señal y es clivada tras un residuo conservado de glicina en la posición -1 por la peptidasa PilD, dejando un residuo de fenilalanina expuesto para su metilación (Strom y Lory, 1991), ii) una región de residuos hidrófobos tras la altamente conservada zona de clivaje GF, la cual comienza con un residuo canónico de ácido glutámico en la posición +5, que es fundamental para la metilación (MacDonald *et al.*, 1993) y iii) dos residuos de cisteína en las posiciones +24 y +27 que confieren estabilidad al pilus y que han sido caracterizados como residuos relevantes para el apilamiento de subunidades de pilina (Craig *et al.* 2004). Así, la presencia de estos motivos moleculares entrega pistas valiosas sobre la funcionalidad de la proteína PilA de *P. salmonis*, puesto que las características mencionadas anteriormente se consideran esenciales para el ensamble y función del pili en su conjunto.

Respecto a la estructura secundaria de los pili de tipo IV, en la mayoría de los modelos bacterianos es homogénea y se ve reflejada en el modelamiento de la proteína principal PilA, la cual está formada en la zona N-terminal por una alfa-hélice, la cual contiene dominios hidrófobos y una región C-terminal que está empaquetada en 4 hojas beta antiparalelas, formando una cabeza globular, todo esto separado por bucles  $\alpha/\beta$  (también llamados “bucles de azúcar” o *sugar loops*), los cuales conectan ambas partes de la estructura y flanquean el dominio globular (Craig *et al.*, 2004; Giltner *et al.*, 2012).

Esta conservación de la estructura secundaria del pili tipo IV permite realizar estudios en los que genes de pili de una especie pueden ser transferidos o coexpresados mediante protocolos de transformación a otras bacterias (Elleman *et al.*, 1986; Hoyne *et al.*, 1992; Winther-Larsen *et al.*, 2007). La estructura predicha para PilA de *P. salmonis* muestra una topología similar a aquella de *P. aeruginosa* cepa PAK, como un valor RMSD de 1,8Å, lo cual indica que ambas estructuras poseen un plegamiento similar. A pesar de que en este caso sólo constituye una aproximación primaria, los valores de RMSD (*Root Mean Square Deviation*) son generalmente útiles para medir las diferencias en distancia entre los átomos de dos estructuras proteicas superimpuestas (Maiorov y Crippen, 1994).

Estructuralmente en la mayoría de los modelos bacterianos el pili tipo IV es similar y bastante característico, presentando filamentos largos y delgados de aproximadamente de 5-9 nm de ancho y pueden llegar a tener varias micras de largo. Además, suelen ubicarse en una posición polar y cuando sus niveles de expresión son altos pueden agruparse lateralmente formando haces (Craig *et al.*, 2006). A pesar de esto, la expresión y fenotipo del pili tipo IV puede variar entre cepas de la misma especie (Kehl-Fie *et al.*, 2008; Salomonsson *et al.*, 2011) y depende de factores como la presencia de ciertos componentes de la maquinaria de pili (Kehl-Fie *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 1997), condiciones de cultivo y variación de fase (Jonsson *et al.*, 1991; Rytönen *et al.*, 2004). Los filamentos observados a través de microscopía electrónica de transmisión y propuestos como estructuras tipo pili, poseen una típica morfología de pili tipo IV, pero su escasez sugiere una baja expresión basal, lo que puede deberse a la ausencia de elementos regulatorias que pueden promover la expresión del pili como el sistema de dos componentes PilRS (no se hallaron homólogos en el genoma de la cepa LF-89), un impedimento en la salida

del pili desde la membrana debido una proteína de plataforma PilC alterada como consecuencia de un elemento transponible localizado en el gen *pilC* o condiciones de cultivo no óptimas para la expresión de pilus. Otra posibilidad es que la manipulación de las bacterias para el proceso de tinción negativa utilizado en este estudio genere la pérdida del pilus por tensión mecánica o por efecto del agua (Touhami *et al.*, 2006) o una ATPasa PilT cuya función pueda estar disminuida, puesto que también se observaron filamentos de pili sueltos, lo que puede indicar un quiebre del filamento (Maier *et al.*, 2004). Finalmente, el análisis proteómico identificó varias componentes de pili tipo IV, siendo los más relevante PilA (a partir de 4 péptidos únicos) y la proteína de plataforma PilC, la cual también se encontró previamente en el proteoma de las vesículas de membrana externa de *P. salmonis* (Oliver *et al.*, 2017). Esto permite sugerir fuertemente que *P. salmonis* presenta una estructura de pilus tipo IV.

Este es el primer trabajo que describe la identificación y caracterización de genes de pilus tipo IV en *P. salmonis*. Además, se describieron componentes de la maquinaria de pilus en la cepa de referencia LF-89, reportándose un perfil de expresión a nivel de transcritos durante una infección *in vitro*, análisis proteómico y se observaron estructuras de tipo pilus. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren la presencia de un pilus de tipo IV en *P. salmonis*. Así, futuras investigaciones deben centrarse en aspectos como: i) determinar los componentes críticos para la piliación de *P. salmonis*, ii) identificar elementos reguladores de la expresión de pilus, iii) explorar el potencial de la pilina PilA de *P. salmonis* en formulaciones de vacunas y/o adyuvantes y iv) estudiar el papel del pilus tipo IV en procesos como la adhesión a las células del hospedero y formación de

biopelículas, todo esto con el objetivo de lograr una mayor comprensión de la patogénesis molecular de *P. salmonis*.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aas, F. E., Wolfgang, M., Frye, S., Dunham, S., Løvold, C., & Koomey, M. (2002). Competence for natural transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: components of DNA binding and uptake linked to type IV pilus expression. *Molecular Microbiology*, 46(3), 749-760.
- Alm, R. A., Boderer, A. J., Free, P. D., & Mattick, J. S. (1996). Identification of a novel gene, pilZ, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 178(1), 46–53.
- Alm, R. A., & Mattick, J. S. (1996). Identification of two genes with prepilin-like leader sequences involved in type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 178(13), 3809–3817.
- Alm, R. A., & Mattick, J. S. (1997). Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 192(1), 89–98.
- Almendras F.E., Fuentealba I.C., Markham F. & Speare D.J. (2000). Pathogenesis of liver lesions caused by experimental infection with *Piscirickettsia salmonis* in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, 552.
- Bakaletz, L. O., Munson, R. S. (2016) *Haemophilus influenzae* Type IV PILI. Patente US 20160175424 A1.
- Balin, D. (2015) SRS: una enfermedad que clama por nuevas soluciones. *SalmonExpert*.

Banadkoki, A. Z., Keshavarzmehr, M., Afshar, Z., Aleyasin, N., Fatemi, M. J., Behrouz, B., Hashemi, F. B. (2016) Protective effect of pilin protein with alum+naloxone adjuvant against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Biologicals*, 44(5), 367-73.

Berry, J. L., & Pelicic, V. (2014). Exceptionally widespread nanomachines composed of type IV pilins: the prokaryotic Swiss Army knives. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(1), 134-154.

Bertozzi Silva, J., Storms, Z., & Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiology Letters*, 363(4), fnw002.

Bohle, H., Henríquez, P., Grothusen, H., Navas, E., Bustamante, F., Bustos, P., & Mancilla, M. (2017). The Genome Sequence of an Oxytetracycline-Resistant Isolate of the Fish Pathogen *Piscirickettsia salmonis* Harbors a Multidrug Resistance Plasmid. 5(5): e01571-16.

Boyd, J. M., Dacanay, A., Knickle, L. C., Touhami, A., Brown, L. L., Jericho, M. H., ... Reith, M. (2008). Contribution of type IV pili to the virulence of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Infection and Immunity*, 76(4), 1445–1455.

Boyd, J. M., Koga, T., & Lory, S. (1994). Identification and characterization of PilS, an essential regulator of pilin expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular and General Genetics*, 243(5), 565–574.

Branson, E.J., Díaz-Muñoz, D. (1991). Description of a new disease condition occurring in farmed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), in South America. *Journal of Fish Diseases*, 14(2), 147–156.

Bravo, S., & Campos, M. (1989). Coho salmon syndrome in Chile. *FHS/AFS Newsletter*, 17(3), 3.

Brinton, C. (1988) Pili of *Neisseria* and vaccine compositions containing same... Patente US 4769240 A.

Brinton, C. (1982) Pili of *Pseudomonas aeruginosa* and utilization of same as vaccines against infectious *P. aeruginosa*. Patente EP 0048422 A2.

Brown, D. R., Helaine, S., Carbonnelle, E., & Pelicic, V. (2010). Systematic functional analysis reveals that a set of seven genes is involved in fine-tuning of the multiple functions mediated by type IV pili in *Neisseria meningitidis*. *Infection and Immunity*, 78(7), 3053–3063.

Campanella, J. J., Bitincka, L., & Smalley, J. (2003). MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics*, 4(1), 29.

Carbonnelle, E., Helaine, S., Nassif, X., & Pelicic, V. (2006). A systematic genetic analysis in *Neisseria meningitidis* defines the Pil proteins required for assembly, functionality, stabilization and export of type IV pili. *Molecular Microbiology*, 61(6), 1510–1522.

- Carbonnelle, E., Hélaine, S., Prouvensier, L., Nassif, X., & Pelicic, V. (2005). Type IV pilus biogenesis in *Neisseria meningitidis*: PilW is involved in a step occurring after pilus assembly, essential for fibre stability and function. *Molecular Microbiology*, 55(1), 54–64.
- Cehovin, A., Kroll, J. S., Pelicic V. (2011) Testing the vaccine potential of PilV, PilX and ComP, minor subunits of *Neisseria meningitidis* type IV pili. *Vaccine*. 29(40), 6858-6865.
- Chan, K.-G., Priya, K., Chang, C.-Y., Abdul Rahman, A. Y., Tee, K. K., & Yin, W.-F. (2016). Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 grown at both body and elevated temperatures. *PeerJ*, 4, e2223.
- Chang, Y.-W., Rettberg, L. A., Treuner-Lange, A., Iwasa, J., Sogaard-Andersen, L., & Jensen, G. J. (2016). Architecture of the type IVa pilus machine. *Science*, 351(6278), aad2001.
- Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., ... & Hultgren, S. J. (2002). Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*, 295(5556), 851-855.
- Collins, R.F., Davidsen, L., Derrick, J.P., Ford, R.C. Tonjum, T. (2001) Analysis of the PilQ secretin from *Neisseria meningitidis* by transmission electron microscopy reveals a dodecameric quaternary structure. *Journal of Bacteriology*. 183, 3825–383 2.
- Collins, R. F., Frye, S. A., Balasingham, S., Ford, R. C., Tønjum, T., & Derrick, J. P. (2005). Interaction with type IV pili induces structural changes in the bacterial outer membrane secretin PilQ. *Journal of Biological Chemistry*, 280(19), 18923–18930.

- Cortés, M., Sánchez, P., Ruiz, P., Haro, R., Sáez, J., Sánchez, F., ... Yáñez, A. J. (2017). *In vitro* expression of Sec-dependent pathway and type 4B secretion system in *Piscirickettsia salmonis*. *Microbial Pathogenesis*, 110, 586–593.
- Craig, L., Pique, M. E., & Tainer, J. A. (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 2(5), 363–378.
- Craig, L., Volkmann, N., Arvai, A. S., Pique, M. E., Yeager, M., Egelman, E. H., & Tainer, J. A. (2006). Type IV Pilus Structure by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography: Implications for Pilus Assembly and Functions. *Molecular Cell*, 23(5), 651–662.
- Craig, L., and Li, J. (2008). Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 267–277.
- Cvitanich J., Gárate O. & Smith C.E. (1990) Etiological agent in a Chilean coho disease isolated and confirmed by Koch's postulates. *American Fisheries Society Newsletter*, 18, 1–2.
- Delany, I., Rappuoli, R., & Seib, K. L. (2013). Vaccines, reverse vaccinology, and bacterial pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(5).
- Doig, P., Todd, T., Sastry, P. A., Lee, K. K., Hodges, R. S., Paranchych, W., & Irvin, R. T. (1988). Role of Pili in Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to Human Respiratory Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 56(6), 1641–1646.
- Donnenberg, M. (2013) Engineered Type IV Pilin of *Clostridium difficile*. Patente US 9310381 B2.

- Dunger, G., Llonet, E., Guzzo, C. R., & Farah, C. S. (2016). The Xanthomonas type IV pilus. *Current Opinion in Microbiology*, 30, 88–97.
- Elleman, T. C., Hoyne, P. A., Stewart, D. J., McKern, N. M., & Peterson, J. E. (1986). Expression of pili from *Bacteroides nodosus* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 168(2), 574–580.
- Fernandes, P. J., Guo, Q., Waag, D. M., Donnenberg, M. (2007) The Type IV Pilin of *Burkholderia mallei* Is Highly Immunogenic but Fails to Protect against Lethal Aerosol Challenge in a Murine Model. *Infect. Immun.* 75(6), 3027-3032.
- Frans, I., Busschaert, P., Dierckens, K., Michiels, C. W., Willems, K. A., Lievens, B., ... Rediers, H. (2013). Are type IV pili involved in *Vibrio anguillarum* virulence towards sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae? *Agricultural Sciences*, 4(6), 30–38.
- Fryer, J.L.; Lannan, C.N.; Giovannoni, S. J. et al. (1992). *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 120-126.
- Georgiadou, M., Pelicic V. (2014). Type IV Pili: Functions and Biogenesis. En: Barocchi M., Telford, J. L. Bacterial Pili: Structure, Synthesis and Role in Disease. CABI, Cambridge University Press. Pág: 71-84.
- Gil, H., Benach, J. L., & Thanassi, D. G. (2004). Presence of Pili on the Surface of *Francisella tularensis*. *Infection and Immunity*, 72(5), 3042–3047.
- Giltner, C. L., Nguyen, Y., & Burrows, L. L. (2012). Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Modules. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 740–772.

Gómez, F. A., Cárdenas, C., Henríquez, V., & Marshall, S. H. (2011). Characterization of a functional toxin–antitoxin module in the genome of the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *FEMS Microbiology Letters*, 317(1), 83-92.

Gómez, F. A., Tobar, J. A., Henríquez, V., Sola, M., Altamirano, C., & Marshall, S. H. (2013). Evidence of the Presence of a Functional Dot/Icm Type IV-B Secretion System in the Fish Bacterial Pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *PLoS ONE*, 8(1).

Goosens, V. J., Busch, A., Georgiadou, M., Castagnini, M., Forest, K. T., Waksman, G., & Pelicic, V. (2017). Reconstitution of a minimal machinery capable of assembling periplasmic type IV pili. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(25), E4978–E4986.

Hagblom, P., Segal, E., Billyard, E., Magdalene So, M. (1985) Intragenic recombination leads to pilus antigenic variation in *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature*. 315: 156 - 158.

Heidelberg, J. F., Eisen, J. a, Nelson, W. C., Clayton, R. a, Gwinn, M. L., Dodson, R. J., ... Fraser, C. M. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*, 406(6795), 477–483.

Hofmann, K., & Stoffel, W. (1993). TMbase: A Database of Membrane Spanning Protein Segments. *Biological Chemistry*, 374, 166.

Holm, L., & Rosenström, P. (2010). Dali server: Conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Research*, 38(SUPPL. 2), 545–549.

Horzempa J., Held T.K., Cross A.S., Furst D., Qutyan M., Neely A.N., Castric P. (2008) Immunization with a *Pseudomonas aeruginosa* 1244 pilin provides O-antigen-specific protection. *Clin Vaccine Immunol.* 15(4): 590-7.

Hospenthal, M. K., Costa, T. R. D., & Waksman, G. (2017). A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 15(6), 365–379.

Hoyne, P. A., Haas, R., Meyer, T. F., Davies, J. K., & Elleman, T. C. (1992). Production of *Neisseria gonorrhoeae* pili (fimbriae) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 174(22), 7321–7327.

Jakovljevic, V., Leonardy, S., Hoppert, M., & Søgaard-Andersen, L. (2008). PilB and PilT are ATPases acting antagonistically in type IV pilus function in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2411–2421.

Jonsson, A. B., Nyberg, G., & Normark, S. (1991). Phase variation of gonococcal pili by frameshift mutation in pilC, a novel gene for pilus assembly. *The EMBO Journal*, 10(2), 477–88.

Kehl-Fie, T. E., Miller, S. E., & St. Geme, J. W. (2008). *Kingella kingae* expresses type IV pili that mediate adherence to respiratory epithelial and synovial cells. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 7157–7163.

Kehl-Fie, T. E., Porsch, E. A., Miller, S. E., & St. Geme, J. W. (2009). Expression of *Kingella kingae* type IV pili is regulated by  $\sigma_{54}$ , PilS, and PilR. *Journal of Bacteriology*, 191(15), 4976–4986.

Koo, J., Tammam, S., Ku, S. Y., Sampaleanu, L. M., Burrows, L. L., & Howell, P. L. (2008). PilF is an outer membrane lipoprotein required for multimerization and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus secretin. *Journal of Bacteriology*, 190(21), 6961–6969.

Korpi, F., Hashemi, F. B., Irajian, G., Fatemi, M. J., Laghaei, P., & Behrouz, B. (2016). Flagellin and pilin immunization against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* protects mice in the burn wound sepsis model. *Immunology Letters*, 176, 8-17.

Krivan, H. C., Ginsburg, V. & Roberts, D. D. (1988) *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from cystic fibrosis patients bind specifically to gangliotetraosylceramide (asialo GM1) and gangliotriaosylceramide (asialo GM2). *Arch. Biochem. Biophys.* 260, 493–496.

LaPointe, C.F., Taylor, R.K. (2000). The type 4 prepilin peptidases comprise a novel family of aspartic acid proteases. *J. Biol. Chem.* 275: 1502–1510.

Leighton, T. L., Buensuceso, R. N., Howell, P. L., & Burrows, L. L. (2015). Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function. *Environmental Microbiology*, 17(11), 4148-4163.

Loh, J. M., Lorenz, N., Tsai, C. J. Y., Khemlani, A. H. J., & Proft, T. (2017). Mucosal vaccination with pili from Group A Streptococcus expressed on *Lactococcus lactis* generates protective immune responses. *Scientific Reports*, 7(1), 7174.

Macdonald, D. L., Pasloske, B. L., & Paranchych, W. (1993). Mutations in the fifth-position glutamate in *Pseudomonas aeruginosa* pilin affect the transmethylation of the N-terminal phenylalanine. *Canadian Journal of Microbiology*, 39(5), 500–5.

Maier, B., Potter, L., So, M., Seifert, H. S., & Sheetz, M. P. (2002). Single pilus motor forces exceed 100 pN. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 16012-16017.

Maier, B., Koomey, M., & Sheetz, M. P. (2004). A force-dependent switch reverses type IV pilus retraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(30), 10961-10966.

Maierov, V. N., & Crippen, G. M. (1994). Significance of Root-Mean-Square Deviation in Comparing Three-dimensional Structures of Globular Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 235, 625-634.

Maldarelli, G.A., De Masi, L., von Rosenvinge, E.C.; Carter, M.; Donnenberg, M.S. (2014) Identification, Immunogenicity and Crossreactivity of Type IV Pilin and Pilin-like Proteins from *Clostridium difficile*. *Pathog Dis.* 71(3), 302–314.

Mattick, J. S. (2002). Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 289–314.

Masada, C. L., LaPatra, S. E., Morton, A. W., & Strom, M. S. (2002). An *Aeromonas salmonicida* type IV pilin is required for virulence in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 51(1), 13-25.

Melville, S., & Craig, L. (2013). Type IV Pili in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(3), 323–341.

Mokrzan, E. M., Ward, M. O., & Bakaletz, L. O. (2016). Type IV pilus expression is upregulated in nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms formed at the temperature of the human nasopharynx. *Journal of Bacteriology*, 198(19), 2619–2630.

Nourdin-Galindo, G., Sánchez, P., Molina, C. F., Espinoza-Rojas, D. A., Oliver, C., Ruiz, P., ... Yáñez, A. J. (2017). Comparative Pan-Genome Analysis of *Piscirickettsia salmonis* Reveals Genomic Divergences within Genogroups. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 1–16.

Nunn D., Bergman S., Lory S. (1990) Products of three accessory genes, pilB, pilC, and pilD, are required for biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili. *J Bacteriol.* 172(6), 2911-9.

Nunn, D. N., & Lory, S. (1991). Product of the *Pseudomonas aeruginosa* gene pilD is a prepilin leader peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(8), 3281–5.

Oliver, C., Hernández, M. A., Tandberg, J. I., Valenzuela, K. N., Lagos, L. X., Haro, R. E., ... Yáñez, A. J. (2017). The Proteome of Biologically Active Membrane Vesicles from *Piscirickettsia salmonis* LF-89 Type Strain Identifies Plasmid-Encoded Putative Toxins. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 420.

Oliver, C., Valenzuela, K., Hernández, M., Sandoval, R., Haro, R. E., Avendaño-Herrera, R., ... & Yáñez, A. J. (2016). Characterization and pathogenic role of outer membrane

vesicles produced by the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis* under in vitro conditions. *Veterinary microbiology*, 184, 94-101.

Oliver, C., Valenzuela, K., Silva, H., Haro, R. E., Cortés, M., Sandoval, R., ... Yáñez, A. J. (2015). Effectiveness of egg yolk immunoglobulin against the intracellular salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 365–376.

Paranjpye, R. N., & Strom, M. S. (2005). A *Vibrio vulnificus* type IV pilin contributes to biofilm formation, adherence to epithelial cells, and virulence. *Infection and Immunity*, 73(3), 1411-1422.

Patel, P., Marrs, C. F., Mattick, J. S., Ruehl, W. W., Taylor, R. K., Koomey, M. (1991) Shared antigenicity of type 4 pilins expressed by *Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella bovis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Dichelobacter nodosus*, and *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 59, 4674–4676.

Peabody, C., Chung, Y., Yen, M., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A., Saier, M. J. (2003). Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology*. 149, 3051–3072.

Pellicic, V. (2008). Type IV pili: *e pluribus unum*? *Molecular Microbiology*, 68(4), 827–837.

Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785–786.

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45-e45.

Pohlschroder, M., Ghosh, A., Tripepi, M., & Albers, S. V. (2011). Archaeal type IV pilus-like structures—evolutionarily conserved prokaryotic surface organelles. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 357-363.

Pulgar, R., Travisany, D., Zuñiga, A., Maass, A., & Cambiazo, V. (2015). Complete genome sequence of *Piscirickettsia salmonis* LF-89 (ATCC VR-1361) a major pathogen of farmed salmonid fish. *Journal of Biotechnology*, 212, 30–31.

Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., & Lopez, R. (2005). InterProScan: Protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, 33, 116–120.

Rise M.L., Jones S.R.M., Brown G.D., Von Schalburg K.R., Davidson W.S. & Koop B.F. (2004) Microarray analyses identify molecular biomarkers of Atlantic salmon macrophage and hematopoietic kidney response to *Piscirickettsia salmonis* infection. *Physiology Genomics* 20, 21–35.

Rytkönen, A., Albiger, B., Hansson-Palo, P., Källström, H., Olcén, P., Fredlund, H., & Jonsson, A.-B. (2004). *Neisseria meningitidis* undergoes PilC phase variation and PilE sequence variation during invasive disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(3), 402–9.

Rozas, M., & Enríquez, R. (2014). Piscirickettsiosis and *Piscirickettsia salmonis* in fish: a review. *Journal of fish diseases*, 37(3), 163-188.

Rozas-Serri, M., Peña, A., Arriagada, G., Enríquez, R., & Maldonado, L. (2017). Comparison of gene expression in post-smolt Atlantic salmon challenged by LF-89-like

and EM-90-like *Piscirickettsia salmonis* isolates reveals differences in the immune response associated with pathogenicity. *Journal of fish diseases*, 2017, 1-14.

Salomonsson, E. N., Forslund, A. L., & Forsberg, Å. (2011). Type IV pili in *Francisella* - A virulence trait in an intracellular pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1–7.

Sandoval, R., Oliver, C., Valdivia, S., Valenzuela, K., Haro, R. E., Sánchez, P., ... Yáñez, A. J. (2016). Resistance-nodulation-division efflux pump *acrAB* is modulated by florfenicol and contributes to drug resistance in the fish pathogen *Piscirickettsia salmonis*. *FEMS Microbiology Letters*, 363(11), 1–7.

Schäfer J., Alvarado V., Enríquez R. & Monrás M. (1990) The “Coho Salmon Syndrome” (CSS): a new disease in Chilean salmon, reared in sea water. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 10, 130.

Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., & Peitsch, M. C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3381-3385.

Semmler, A. B. T., Whitchurch, C. B., Leech, A. J., & Mattick, J. S. (2000). Identification of a novel gene, *fimV*, involved in twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 146(6), 1321–1332.

Sernapesca. (2017). Informe Sanitario de Salmonicultura en Centros Marinos Año 2016.

Sernapesca. (2017). Informe sobre uso de antimicrobianos en la salmonicultura nacional, año 2016. Ministerio de Economía, Fomento y Turismo. 13 págs.

Sharma, A., Krause, A., & Worgall, S. (2011). Recent developments for *Pseudomonas* vaccines. *Human Vaccines*, 7(10), 999–1011.

- Stone, B. J., & Abu Kwaik, Y. (1998). Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infection and Immunity*, 66(4), 1768–1775.
- Strom, M. S., & Lory, S. (1991). Amino Acid Substitutions in Pilin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 26(3), 1656–1664.
- Strom, M. S., & Lory, S. (1993). Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annual Review of Microbiology*, 47, 565–596.
- Sure, S., Torriero, A. A., Gaur, A., Li, L. H., Chen, Y., Tripathi, C., ... & Kochar, M. (2015). Inquisition of *Microcystis aeruginosa* and *Synechocystis* nanowires: characterization and modelling. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 108(5), 1213-1225.
- Swanson J. (1973). Studies on gonococcus infection. IV. *Pili*: their role in attachment of gonococci to tissue culture cells. *J. Exp. Med.* 137, 571–589.
- Szeto, T.H., Dessen, A. Pelicic, V. (2011) Structure/function analysis of *Neisseria meningitidis* PilW, a conserved protein playing multiple roles in type IV pilus biology. *Infection and Immunity*. 79, 3028–3035.
- Tacchi, L., Bron, J. E., Taggart, J. B., Secombes, C. J., Bickerdike, R., Adler, M. A., ... & Martin, S. A. (2011). Multiple tissue transcriptomic responses to *Piscirickettsia salmonis* in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Physiological Genomics*, 43(21), 1241-1254.
- Tammam, S., Sampaleanu, L. M., Koo, J., Manoharan, K., Daubaras, M., Burrows, L. L., & Howell, P. L. (2013). PilMNOPQ from the *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus

system form a transenvelope protein interaction network that interacts with PilA. *Journal of Bacteriology*, 195(10), 2126–2135.

Tammam, S., Howell, P.L., Burrows, L. (2014). The *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pilus Assembly System in Three Dimensions. En: Barocchi M., Telford, J. L. (ed) *Bacterial Pili: Structure, Synthesis and Role in Disease*. CABI, Cambridge University Press. Pág: 85-99.

Tandberg, J. I., Lagos, L. X., Langlete, P., Berger, E., Rishovd, A. L., Roos, N., ... Winther-Larsen, H. C. (2016). Comparative analysis of membrane vesicles from three *Piscirickettsia salmonis* isolates reveals differences in vesicle characteristics. *PLoS ONE*, 11(10), 1–27.

Thanassi, D. G., Saulino, E. T., & Hultgren, S. J. (1998). The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Current Opinion in Microbiology*, 1(2), 223-231.

Theelin, K. H., & Taylor, R. K. (1996). Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. *Infection and Immunity*, 64(7), 2853-2856.

Touhami, A., Jericho, M. H., Boyd, J. M., & Beveridge, T. J. (2006). Nanoscale characterization and determination of adhesion forces of *Pseudomonas aeruginosa* pili by using atomic force microscopy. *Journal of bacteriology*, 188(2), 370-377.

van Schaik, E. J., Giltner, C. L., Audette, G. F., Keizer, D. W., Bautista, D. L., Slupsky, C. M., ... & Irvin, R. T. (2005). DNA binding: a novel function of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *Journal of Bacteriology*, 187(4), 1455-1464.

Waite, R. D., Papakonstantinou, A., Littler, E., & Curtis, M. a. (2005). Transcriptome Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Growth: Comparison of Gene Expression in Planktonic Cultures and Developing and Mature Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6571–6576.

Weiss, R. L., & Raj, H. (1972). Structure and Isolation of Pili (Fimbriae) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 50(5), 559–566.

Winther-Larsen, H. C., Wolfgang, M. C., Van Putten, J. P. M., Roos, N., Aas, F. E., Egge-Jacobsen, W. M., ... Koomey, M. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilus expression in *Neisseria gonorrhoeae*: Effects of pilin subunit composition on function and organelle dynamics. *Journal of Bacteriology*, 189(18), 6676–6685.

Wolfgang, M., Park, H.S., Hayes, S.F., van Putten, J.P. Koomey, M. (1998) Suppression of an absolute defect in type IV pilus biogenesis by loss-of-function mutations in pilT, a twitching motility gene in *Neisseria gonorrhoeae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95, 14973–14978.

Wu, S. S., Kaiser, D., & Wu, S. S. (1997). Regulation of expression of the pilA gene in Regulation of Expression of the pilA Gene in *Myxococcus xanthus*. *J. Bac.*, 179(24), 7748–7758.

- Xu, Q., Shoji, M., Shibata, S., Naito, M., Sato, K., Elsliger, M. A., ... & Jaroszewski, L. (2016). A distinct type of pilus from the human microbiome. *Cell*, 165(3), 690-703.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2014). The I-TASSER suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods*, 12(1), 7–8.
- Yáñez, A. J., Valenzuela, K., Matzner, C., Olavarría, V., Figueroa, J., Avendaño-Herrera, R., & Carcamo, J. G. (2014). Broth microdilution protocol for minimum inhibitory concentration (MIC) determinations of the intracellular salmonid pathogen *Piscirickettsia salmonis* to florfenicol and oxytetracycline. *Journal of Fish Diseases*, 37(5), 505–509.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134.
- Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., ... Brinkman, F. S. L. (2010). PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, 26(13), 1608–1615.
- Zogaj, X., Chakraborty, S., Liu, J., Thanassi, D., Klose, K. (2008). Characterization of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida* type IV pilus. *Microbiology* 154, 2139–2150.