

ADAPTACIÓN MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN DEL PATÓGENO BACTERIANO *Haemophilus influenzae* CON EL SISTEMA RESPIRATORIO HUMANO

TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD
Curso Académico 2016-2017

Realizado por

Sergio Cuesta Ferre

Dirigido por

Dra. Juncal Garmendia García
Dra. María G. Pérez Garrido

Septiembre, 2017
PAMPLONA

ADAPTACIÓN MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN DEL PATÓGENO BACTERIANO *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* CON EL SISTEMA RESPIRATORIO HUMANO

TRABAJO FIN DE MÁSTER

SERGIO CUESTA FERRE

Directora: Juncal Garmendia García
Codirectora académica: María G. Pérez Garrido

Máster Universitario en Investigación en Ciencias de la Salud
Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad Pública de Navarra

Pamplona, 2017

La **Dra. Juncal Garmendia García**, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y la **Dra. María G. Pérez Garrido**, Doctora interina del grupo de investigación de Genética y Microbiología de la Universidad Pública de Navarra,

CERTIFICAN que el trabajo de investigación que presenta el Graduado en Biotecnología **D. Sergio Cuesta Ferre** con el título “Adaptación molecular de la interacción del patógeno bacteriano *Haemophilus influenzae* con el sistema respiratorio humano” ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Agrobiotecnología (CSIC-UPNa-Gobierno de Navarra), reuniendo las condiciones necesarias para su presentación y posterior defensa ante el tribunal constituido para la evaluación de los Trabajos Fin de Master, del Máster Universitario en Investigación en Ciencias de la Salud.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Pamplona, a 8 de septiembre de 2017

Dra. Juncal Garmendia García

Dra. María G. Pérez Garrido

AGRADECIMIENTOS

Quisiera en primer lugar, saltándome lo protocolario, dedicarle este trabajo a mis padres y abuelos. Gracias por vuestro apoyo incondicional, sin vosotros nada de esto, ni de mi vida en general, hubiera podido hacerse realidad. Gracias por transmitirme unos valores sólidos, sustentados sobre una base de respeto y trabajo duro; gracias a ellos hoy por hoy soy quien soy, y sé a ciencia cierta que podré conseguir lo que me proponga. Gracias por no poder sentirnos más orgullosos de mí, soy consciente que celebráis mis logros con incluso mayor alegría que yo mismo, y eso me da fuerzas para seguir adelante cuando las cosas se ponen difíciles. Os quiero incondicionalmente, y siempre lo haré.

Quiero agradecer a mi directora, Juncal Garmendia, todo el esfuerzo depositado y el tiempo que ha dedicado para que este trabajo se haya podido realizar. También quisiera darle las gracias a María G. Pérez por ser la tutora académica de este trabajo. Gracias a Josefina Linares por brindarnos del material clínico tan imprescindible en este trabajo, así como a Margarita Menéndez y Manuel Iglesias por su trabajo y ayuda en el terreno proteico.

Y cómo olvidarme de vosotros... Irene, Lucifer, Falete, Bego, Ari, Nahikiriki y Sarah*. Gracias por vuestro día a día, por las risas, por entenderme mejor que nadie, por las confesiones en el P2 e incluso, por hacer la del pulpo con tinta de calamar. Al final hasta le cogeré cariño a vuestras navarradas. Sé que no es normal que, tras 12 horas juntos, salgamos y nos queden ganas de aguantarnos las 12 restantes. Pero así es. Habéis sido un pilar fundamental desde que aterricé hace casi dos años en Pamplona, y me siento muy afortunado por ello. Gracias por ser los mejores compañeros de laboratorio que podría imaginar, no os podría haber diseñado mejor ni con CRISPR/Cas9. Os llevo conmigo.

Gracias a mis compis de máster y risas; Raquel, Nerea, Rubén y Silvia. Con vosotros hasta el curso intensivo de bioestadística se hizo ameno.

Y por último agradecer a los incondicionales, a toda esa gente que permanece constante sin importar el tiempo ni la distancia. Gracias en particular a una proporción importante de ellos por ser los perfectos compañeros de aventuras por tierras norteñas. Qué bueno teneros.

Con esto concluyo el apartado de agradecimientos, sintiéndome más que satisfecho por todo el trabajo realizado, y tremendamente emocionado de pensar en las próximas aventuras que están por llegar.

RESUMEN

Haemophilus influenzae no tipificable (HiNT) es una bacteria Gram-negativa que forma parte de la microbiota de la nasofaringe de individuos con función pulmonar normal. En patologías respiratorias como es el caso de la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), HiNT actúa como patógeno oportunista. En este tipo de pacientes, HiNT se establece en las vías respiratorias bajas, empeorando el curso de la enfermedad y siendo responsable de una elevada proporción de episodios de exacerbación asociados a la fragilidad de la EPOC.

El objetivo de este estudio ha sido caracterizar diversos aspectos de la pato-adaptación de *H. influenzae* durante la infección persistente del epitelio respiratorio humano. Para ello, mediante la generación de cepas mutantes, se ha analizado el patrón de expresión de un panel de genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo central de *H. influenzae*, así como el efecto de la variación en la disponibilidad de oxígeno en dicha expresión génica. Por otro lado, se ha identificado un grupo clonal de cepas HiNT aisladas de muestras de esputo de pacientes EPOC con exacerbación que presenta un fenotipo hiperinvasor al infectar el epitelio respiratorio humano. La caracterización de estos aislados ha identificado un mecanismo de regulación de la expresión y traducción de la invasina Hmw1A mediante variación de fase en la región promotora del operón *hmw1ABC*, que tiene implicaciones directas en el fenotipo hiperinvasor de este patógeno. Por último, hemos analizado el papel de la fosfodiesterasa GlpQ de *H. influenzae* durante la infección pulmonar, y generado un panel de herramientas adecuadas para el futuro escrutinio del potencial de esta proteína como diana terapéutica frente a la infección por HiNT.

En conjunto, este trabajo supone un avance en el conocimiento de la patogénesis de *H. influenzae* durante la infección respiratoria asociada a la EPOC, poniendo de manifiesto estrategias de pato-adaptación y revelando el potencial biotecnológico de nuevas dianas terapéuticas.

PALABRAS CLAVE: *Haemophilus influenzae*, Adaptación molecular, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, Invasión epitelial, Metabolismo

ABSTRACT

Non-typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) is a Gram negative bacterium encountered in the nasopharynx of most individuals with normal lung function. Moreover, NTHi is an opportunistic pathogen, which reaches the lower airways of respiratory patients suffering chronic disease conditions such as Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). In those cases, NTHi contributes worsening the course of the disease and triggering acute exacerbations episodes.

The aim of this study has been to characterize a range of aspects related to NTHi patho-adaptation during human respiratory long-term infection. For this purpose, NTHi mutant strains were generated and used to analyze the expression pattern of a panel of genes involved in NTHi central metabolism, together with the effect of changes in oxygen availability in such gene expression. Likewise, we identified a clonal group of NTHi clinical strains isolated from sputum samples of COPD patients at exacerbation, showing a hyper-invader phenotype in the human respiratory epithelium. These isolates characterization showed that expression of the *hmw1A* invasin encoding gene is regulated by phase-variation within the *hmw1ABC* promoter region, therefore regulating Hmw1A translation and having relevant implications in the hyper-invading phenotype of this pathogen. Finally, we analyzed the role of GlpQ, a NTHi phosphodiesterase, on pulmonary infection, purified and further characterized in terms of physical and chemical properties the GlpQ enzyme, which constitutes an adequate tool for further antibacterial drug discovery.

Overall, our work provides new insights into HiNT pathogenesis in the context COPD related respiratory infections. This study reveals previously unknown HiNT patho-adaptation strategies and provides novel tools for antibacterial drug screening.

KEYWORDS: *Haemophilus influenzae*, Molecular adaptation, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Epithelial invasion, Metabolism

ABREVIATURAS

- Ab** – *Antibody*, Anticuerpo
ADN – Ácido desoxirribonucleico
ADNc – ADN complementario
Amp – Ampicilina
ARN – Ácido ribonucleico
ARNm – ARN mensajero
ARNr – ARN ribosomal
ATB - Antibiótico
BCIP – 5-bromo-4-cloro-3-indofosfato
BHI – *Brain Heart Infusion*; Infusión cerebro corazón
β-NAD – β-nicotinamida adenin dinucleótido
Ca²⁺ – Cation Calcio
CDM – *Chemically Defined Medium*; Medio químicamente definido
Cho – Colina
CO₂ – Dióxido de carbono
DMSO – Dimetilsulfóxido
DO – Densidad Óptica
EBSS – *Earle's Balanced Salt Solution*
EPOC – Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
FISH – *Fluorescence In Situ Hybridization*; Hibridación fluorescente *in situ*
FITC – Fluoresceína-5-isotiocianato
FSC – *Forward Scatter*; Detector de dispersión frontal
°C – Grados centígrados
Glc – Glucosa
GlcN – Glucosamina
Gm – Gentamicina
GPC - Glicerolfosforilcolina
h – Horas
Hap – *H. influenzae adherence and penetration protein*; Proteína de adherencia y penetración de *H. influenzae*
Hap_β - Dominio intermembrana de Hap
Hap_ε – Dominio
Hep – Heptosa
Hi – *Haemophilus influenzae*
HiNT – *Haemophilus influenzae* no tipificable
HmWA – *High Molecular Weight protein*; Proteína de alto peso molecular
IgG – Inmunoglobulina G
kDa - Kilodalton
Kdo – Ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosónico
kV – Kilovoltios
l – Litros
Lamp – *Lysosomal associated marker protein*; Proteína marcador asociada a lisosoma
LB – *Loading Buffer*, Tampón de carga
LB – Luria Bertani
LBA – Lavado Broncoalveolar
LOS – Lipooligosacárido
LPS – Lipopolisacárido

M – Molar
MH-F – Müller Hinton Fastidioso
mg – miligramos
Mg²⁺ – Cation magnesio
min – Minutos
µg – Microgramos
µF – Microfaradios
µl – Microlitros
ml – Mililitros
mM – Milimolar
MOI - *Multiplicity Of Infection*; Multiplicidad de infección
ms – Milisegundo
n – Tamaño muestral
nm – Nanómetros
NBT – azul de tetrazolio
O₂ – Oxígeno
PAF – *Platelet Activatin Factor*; Factor activador de plaquetas
PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Patterns*; Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS – *Phosphate Buffered Saline*; Tampón fosfato salino
PCho – Fosforilcolina
PCR – *Polymerase Chain Reaction*; Reacción en cadena de la polimerasa
PFA – Paraformaldehido
qPCR – *Quantitative PCR*; PCR cuantitativa
R – Residuo
RFI – *Relative percent Fluorescence Index*; Porcentaje de índice de fluorescencia relativo
r.p.m. – Revoluciones Por Minuto
RPMI – Medio *Roswell Park Memorial Institute*
s – Segundos
SA – Sulfato amónico
sBHI – BHI suplementado
SDS – Dodecilsulfato Sódico
SDS-PAGE – Electroforesis en gel de Poliacrilamida con SDS
SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*; Polimorfismo de nucleótido simple
Spec – Espectinomicina
SSC – *Side Scatter*; Detector de dispersión lateral
SSR – *Simple Sequence Repeat*; Repeticiones de secuencias cortas de ADN
STF – Suero Bovino Fetal
T^a - Temperatura
TBS – *Tryptone Soya Broth*; Medio triptona de soja
TMAO – N-óxido de Trimetilamina
u.f.c. – Unidades Formadoras de Colonias
UV – Ultravioleta
W - Vatios

ÍNDICE

RESUMEN.....	VII
ABSTRACT	IX
ABREVIATURAS	XI
ÍNDICE	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XVII
ÍNDICE DE TABLAS	XIX
INTRODUCCIÓN	1
1. FISIOLOGÍA DEL SISTEMA RESPIRATORIO HUMANO	3
2. MICROBIOTA DEL APARATO RESPIRATORIO HUMANO.....	4
3. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA.....	5
4. PAPEL DE LA INFECCIÓN BACTERIANA EN EL PROGRESO DE LA EPOC.....	6
5. CARACTERÍSTICAS GENERALES <i>Haemophilus influenzae</i>	7
6. PATO-ADAPTACIÓN EVOLUTIVA DE HiNT EN EL PULMÓN EPOC.....	8
6.1. Variabilidad genética de <i>H. influenzae</i>	8
6.2. Metabolismo central de <i>H. influenzae</i>	9
6.3. Aspectos moleculares de virulencia y patogénesis de HiNT	11
6.3.1. Lipooligosacárido (LOS) de HiNT	11
6.3.1.1. Papel de la fosforilcolina (PCho) en la virulencia de HiNT	12
6.3.2. Infección del epitelio respiratorio humano por HiNT.....	13
6.3.2.1. Adhesión de HiNT al epitelio respiratorio	13
6.3.2.1.1. Hap.....	14
6.3.2.1.2. HmWA	14
6.3.2.2. Invasión del epitelio respiratorio por HiNT	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
1. CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	23
2. CURVAS DE CRECIMIENTO DE <i>H. influenzae</i>	23
3. ENSAYO DE AUTOAGREGACIÓN BACTERIANA	23
4. INMUNODETECCIÓN DE PCho EN <i>H. influenzae</i> A PARTIR DE COLONIA (<i>COLONY BLOT</i>).....	24
5. INMUNODETECCIÓN DE PCho EN <i>H. influenzae</i> MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	24
6. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS.....	25
7. EXTRACCIÓN, RESTRICCIÓN Y MODIFICACIÓN DE ADN.....	25
8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	25
9. MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO	26
9.1. Transformación química de <i>E. coli</i>	26
9.2. Transformación de <i>E. coli</i> mediante electroporación.....	26
9.3. Transformación de <i>H. influenzae</i> mediante inducción de la competencia natural (Método M-IV)....	27
10. GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS Y ESTIRPES BACTERIANAS.....	28
10.1. Generación de las cepas mutantes de HiNT.....	28
11. CULTIVO CELULAR Y MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES.....	30

12. INFECCIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO	30
12.1. Adhesión bacteriana al epitelio respiratorio.....	30
12.2. Invasión bacteriana en el epitelio respiratorio	31
12.3. Vida intracelular bacteriana en el epitelio respiratorio	31
13. TINCIÓN Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	32
14. HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE <i>IN SITU</i>	32
15. INFECCIÓN INTRANASAL EN MODELO ANIMAL MURINO	33
16. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO SÓDICO	34
17. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE <i>WESTERN BLOT</i>	34
18. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE GlpQ _{HiNT375}	34
18.1. Expresión de la proteína GlpQ _{HiNT375}	35
18.2. Lisis y fraccionamiento celular	35
18.3. Precipitación de ácidos nucleicos.....	35
18.4. Precipitación fraccionada de GlpQ _{HiNT375} con sulfato amónico (SA)	35
18.5. Diálisis.....	35
18.6. Cromatografía de intercambio iónico	35
18.7. Determinación de la concentración de la proteína GlpQ _{HiNT375}	36
19. CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE GlpQ _{HiNT375}	36
19.1. Espectrometría de masas (MS).....	36
19.2. Ultracentrifugación analítica (UA).....	36
19.3. Dicroísmo circular (DC)	37
20. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES BACTERIANOS	37
20.1. Extracción de ARN bacteriano.....	37
20.2. Análisis de la calidad del ARN	37
20.3. Retrotranscripción.....	37
20.4. PCR cuantitativa a tiempo real	37
21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38

RESULTADOS

1. ADAPTACIÓN METABÓLICA DE <i>H. influenzae</i> A CONDICIONES CAMBIANTES DE CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO	41
1.1. Análisis del metabolismo de HiNT en condiciones variables de disponibilidad de O ₂	41
1.2. Patrón de expresión de genes implicados en el metabolismo central de <i>H. influenzae</i> en distintas condiciones de disponibilidad de O ₂	42
2. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO HIPERINVASOR DE HiNT EN EL EPITELIO RESPIRATORIO HUMANO	50
2.1. Descripción de la colección de cepas de HiNT aisladas de pacientes EPOC empleada en este trabajo.....	50
2.2. Fenotipo autoagregativo de los aislados clínicos.....	54
2.2.1. Diversidad alélica de Hap en la colección de aislados HiNT.....	54
2.3. Escrutinio de aislados clínicos de HiNT hiperinvasores en el epitelio respiratorio humano	55
2.4. Papel de HmWA en la hiperinvasión del epitelio respiratorio por HiNT.....	57
2.5. Monitorización de la vida intracelular de HiNT en el epitelio respiratorio	59
3. ANÁLISIS DEL PAPEL DE GlpQ DURANTE LA INFECCIÓN RESPIRATORIA POR <i>H. influenzae</i>	62
3.1. Generación de cepas HiNT carentes del gen <i>glpQ</i>	62
3.2. Relación entre GlpQ y PCho en <i>H. influenzae</i>	62
3.3. Implicación de GlpQ en la resistencia de <i>H. influenzae</i> a péptidos antimicrobianos.....	63
3.4. Papel de GlpQ en la infección del epitelio respiratorio por <i>H. influenzae</i>	64
3.5. Diversidad alélica de GlpQ en la colección de aislados clínicos de HiNT en estudio.....	65
3.6. Producción de la proteína de GlpQ _{HiNT375}	68
3.6.1. Generación de un plásmido para la expresión de la proteína recombinante GlpQ _{HiNT375}	68
3.6.2. Establecimiento de condiciones óptimas para la expresión y solubilidad de GlpQ _{HiNT375}	69
3.6.3. Purificación de GlpQ _{HiNT375} a gran escala	70
3.6.4. Caracterización biofísica de GlpQ _{HiNT375}	72

DISCUSIÓN	77
1. <i>H. influenzae</i> REGULA DIFERENCIALMENTE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON SU METABOLISMO CENTRAL SEGÚN LA DISPONIBILIDAD DE O ₂	79
2. LA EXPRESIÓN REGULADA POR VARIACIÓN DE Hmw1A SE RELACIONA CON EL FENOTIPO HIPERINVASOR DE HiNT	81
3. LA FOSFODIESTERASA GIpQ ES UN FACTOR DE VIRULENCIA DE HiNT QUE PUEDE SER EXPLOTADO DESDE EL PUNTO DE VISTA TERAPÉUTICO.....	83
CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFÍA	89
ANEXOS	99
ANEXO I	101
ANEXO II	105
ANEXO III	111
ANEXO IV	131
BORRADOR DE ARTÍCULO CIENTÍFICO.....	137

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del sistema respiratorio humano, dividido en tracto respiratorio superior e inferior.

Figura 2. Determinantes del microbioma respiratorio humano.

Figura 3. Hipótesis del círculo vicioso en la progresión de la EPOC.

Figura 4. Metabolismo central de carbohidratos de *H. influenzae*.

Figura 5. Estructura conservada de la molécula de LOS de *H. influenzae*.

Figura 6. Estructura química de la colina, fosforilcolina, glicerolfosforilcolina (GPC) y el factor activador de plaquetas (PAF).

Figura 7. Modelo de infección del epitelio respiratorio humano por HiNT.

Figura 8. Proceso de disrupción génica del gen *glpQ* ($\Delta glpQ$) en *H. influenzae* mediante una estrategia que implica la sustitución del gen a mutar por un gen de resistencia a espetinomina mediante transformación natural y doble recombinación homóloga.

Figura 9. Niveles normalizados de expresión de 19 genes clave en el metabolismo de carbohidratos en las cepas RdKW20 (barras blancas), RdKW20 $\Delta pflA$ (barras rojas), RdKW20 $\Delta ackA$ (barras amarillas), RdKW20 $\Delta frdA$ (barras naranjas) en condiciones de (A) aerobiosis, y (B) anaerobiosis.

Figura 10. Niveles normalizados de expresión de 19 genes clave en el metabolismo de carbohidratos en las cepas HiNT411 (barras blancas), HiNT411 $\Delta pflA$ (barras verde claras), HiNT411 $\Delta ackA$ (barras azules), HiNT411 $\Delta frdA$ (barras verde oscuras) en condiciones de (A) aerobiosis, y (B) anaerobiosis.

Figura 11. Cambios en el patrón de expresión de genes metabólicos en las cepas RdKW20 $\Delta pflA$, RdKW20 $\Delta ackA$ y RdKW20 $\Delta frdA$ respecto a RdKW20 silvestre.

Figura 12. Cambios en el patrón de expresión de genes metabólicos en las cepas HiNT411 $\Delta pflA$, HiNT411 $\Delta ackA$ y HiNT411 $\Delta frdA$ respecto a HiNT411 silvestre.

Figura 13. Estructura de la colección de aislados clínicos EPOC.

Figura 14. Los 91 aislados clínicos de HiNT presentes en la colección en estudio muestran variabilidad respecto a su capacidad autoagregativa.

Figura 15. Estructura y variabilidad de la proteína Hap en HiNT.

Figura 16. Escrutinio de la colección de aislados clínicos EPOC para identificar cepas de HiNT con fenotipo hiperinvasor.

Figura 17. Caracterización de *hmw1A* y *hmw2A* en las cepas clínicas P651, P652, P653 y P654.

Figura 18. Monitorización de la vida intracelular de HiNT en células A549.

Figura 19. Crecimiento y autoagregación de las cepas RdKW20, RdKW20 $\Delta glpQ$, HiNT375 y HiNT375 $\Delta glpQ$.

Figura 20. GlpQ modula los niveles de PCho en RdKW20 y HiNT375.

Figura 21. Determinación de la CMI del péptido antimicrobiano colistina en cepas de *H. influenzae* silvestres y mutantes $\Delta glpQ$.

Figura 22. Contribución de GlpQ a la infección por *H. influenzae*.

Figura 23. Variabilidad de la proteína GlpQ en HiNT.

Figura 24. Estrategia de clonaje empleada para generar la cepa *E. coli* BL21-pT7.7/*glpQ*_{NTHi375}.

Figura 25. Expresión de GlpQ_{HiNT375} a pequeña escala.

Figura 26. Sistema de expresión de GlpQ_{HiNT375} a gran escala.

Figura 27. Espectros de dicroísmo circular de GlpQ_{HiNT375}.

Figura 28. Análisis de la dinámica de desnaturalización térmica de GlpQ_{HiNT375} y la formación de precipitados.

Figura 29. Ensayos de ultracentrifugación con la proteína GlpQ_{HiNT375}.

Figura 30. Posibles productos metabólicos acumulados durante el crecimiento de *H. influenzae* en sBHI en distintas condiciones de disponibilidad de O₂, al mutar los genes que codifican los enzimas PflA, AckA, y FrdA, respectivamente.

Figura D1. Comparación de las proteínas GlpQ homologas en HINT375 y en *E. Coli*.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales adhesinas e invasinas de *H. influenzae*.

Tabla 2. Preparación del medio M-IV.

Tabla 3. Tiempos de infección en ensayos de vida intracelular.

Tabla 4. Marcadores utilizados para inmunomarcaje específico en el presente trabajo.

Tabla 5. Compuestos clave detectados en el medio de crecimiento de *H. influenzae* RdKW20 (arriba) y HiNT411 (abajo).

Tabla 6. Tabla-resumen de los genes cuya expresión fue analizada (arriba) en las cepas elegidas de *H. influenzae* (centro), y en dos condiciones distintas de disponibilidad de O₂ (abajo).

Tabla 7. Niveles de expresión de cada gen en la cepa RdKW20 en condiciones de aerobiosis (izquierda) y anaerobiosis (derecha).

Tabla 8. Niveles de expresión de cada gen en la cepa HiNT411 en condiciones de aerobiosis (izquierda) y anaerobiosis (derecha).

Tabla 9. Información relativa a las cepas clínicas de HiNT que componen la colección de aislados clínicos EPOC.

Tabla 10. Análisis comparado de la secuencia proteica de las adhesinas HmWA_{P652} con sus parálogos en 86-028NP.

Tabla 11. Distribución alélica de GlpQ en la colección de aislados clínicos de HiNT.

Tabla A1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Tabla A2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Tabla A3. Cebadores utilizados en este trabajo.

Tabla B1. Comparativa de los niveles de expresión génica entre aerobiosis y anaerobiosis en RdKW20 (arriba), y HiNT411 (abajo).

Tabla B2. Comparativa de los niveles de expresión génica entre RdKW20 y mutantes en aerobiosis.

Tabla B3. Comparativa de los niveles de expresión génica entre RdKW20 y mutantes en anaerobiosis.

Tabla B4. Comparativa de los niveles de expresión génica entre HiNT411 y mutantes en aerobiosis.

Tabla B5. Comparativa de los niveles de expresión génica entre HiNT411 y mutantes en anaerobiosis.

Tabla C1. Distribución alélica de Hap en la colección de aislados clínicos según grupo clonal.

Tabla D1. Posiciones con polimorfismos en la secuencia proteica de GlpQ ya descritas para *H. influenzae*.



INTRODUCCIÓN

1. FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA RESPIRATORIO HUMANO

El sistema respiratorio humano está integrado por los dos pulmones y el tracto respiratorio que constituye el conjunto de conductos aéreos que comunica los pulmones con el exterior. La principal función del aparato respiratorio es el intercambio de gases entre la sangre y el medio exterior. El oxígeno (O₂) es captado del exterior y debe alcanzar los tejidos, que lo requieren de modo esencial para su metabolismo. Asimismo, el metabolismo celular genera como producto dióxido de carbono (CO₂), que es eliminado al exterior a través del tracto respiratorio. Las vías respiratorias se dividen anatómicamente en tracto respiratorio superior e inferior (**Figura 1**). Las vías superiores están compuestas por las cavidades nasal y bucal, vías principal y secundaria, de entrada y salida de aire, respectivamente, así como por la faringe. La faringe está dividida en: (i) nasofaringe (donde desemboca la cavidad nasal), (ii) orofaringe (próxima a la cavidad bucal), e (iii) hipofaringe (en contacto con la laringe). Las vías respiratorias inferiores están formadas por laringe, tráquea y bronquios. Los bronquios se ramifican e introducen en los pulmones con conductos de cada vez menor diámetro, que forman el árbol bronquial: bronquios secundarios, terciarios, bronquiolos, bronquiolos terminales, bronquiolos respiratorios y alveolos. Los alveolos son las estructuras donde se produce el intercambio gaseoso (Gartner y Hiatt 2002).

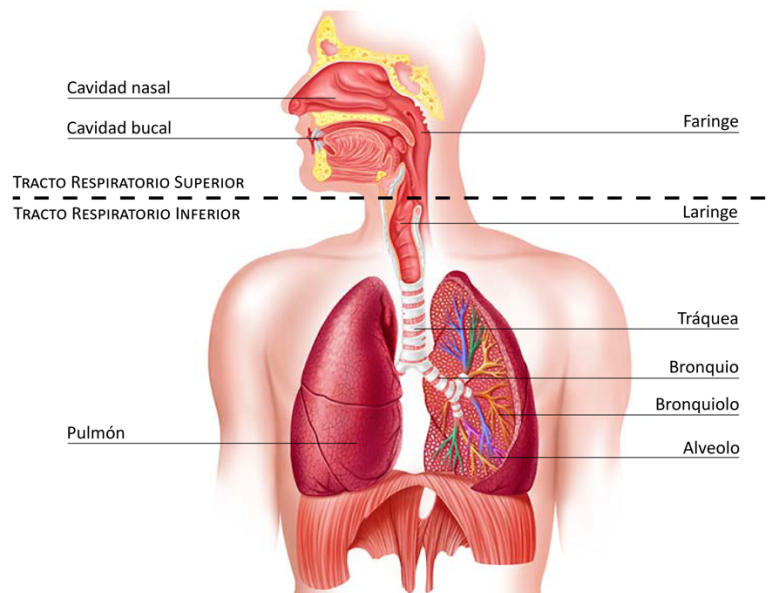


Figura 1. Representación esquemática del sistema respiratorio humano, dividido en tracto respiratorio superior e inferior.

Los conductos respiratorios son también una vía de entrada de elementos externos potencialmente perjudiciales para la salud, como compuestos inhalados, partículas, alérgenos y microorganismos. El tracto respiratorio posee barreras para evitar la entrada al organismo de estos agentes. Así, la faringe y laringe están recubiertas de la mucosa respiratoria, cuyo transporte mucociliar constituye un mecanismo de defensa local. La mucosa respiratoria está formada por epitelio cilíndrico ciliado, formado por células cilíndricas ciliadas, células basales y células calciformes, todas en una proporción similar. Estas últimas son las responsables de secretar el moco, formado por mucina y otras glicoproteínas, que evita que las partículas y microorganismos accedan al epitelio, atrapándolos y eliminándolos al exterior en conjunto con el movimiento ciliar de las células cilíndricas. La tráquea y los bronquios están sustentados por anillos de cartílago y tejido muscular liso muy sensible a la presión, responsable del reflejo de la tos, de forma que, al detectar partículas extrañas o irritantes, estas sean eliminadas al exterior (Guyton, 2006). Los alveolos están formados por tejido epitelial escamoso, con neumocitos o

células alveolares de tipos I y II. Los neumocitos tipo I recubren el 95% de la superficie alveolar, y son los encargados de realizar el intercambio gaseoso. Los neumocitos tipo II representan el 60% de las células del epitelio alveolar y el 10-15% del total de células del pulmón, a pesar de ocupar únicamente el 5% de la superficie alveolar. Mientras que los neumocitos tipo I se encargan de mantener la homeostasis alveolar, los neumocitos tipo II se encargan de la síntesis, secreción y reabsorción de surfactante pulmonar, que presenta propiedades antimicrobianas y evita el colapso de los alveolos, además de intervenir en la síntesis de compuestos xenobióticos, el transporte de agua y sodio, y la regeneración tisular (Castranova *et al.* 1988). Además, intervienen activamente en la respuesta defensiva innata: (i) constituyendo una barrera epitelial física que evita la infección sistémica, (ii) reconociendo patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) que inducen la activación o represión de cascadas de transducción de señales, y (iii) secretando péptidos antimicrobianos y mediadores pro-inflamatorios como citoquinas y quimiocinas. Los neumocitos tipo II juegan un papel esencial en el mantenimiento de la función pulmonar y la respuesta defensiva frente a microorganismos patógenos, y han sido empleados como herramienta de estudio en el presente trabajo.

2. MICROBIOTA DEL APARATO RESPIRATORIO HUMANO

La piel y las mucosas humanas son colonizadas tras el nacimiento por un conjunto de microorganismos que constituyen la microbiota normal humana. Los aparatos digestivo y respiratorio son los principales sistemas que presentan órganos recubiertos de mucosas. A pesar de tener un origen embrionario común, el tracto respiratorio presenta características exclusivas que repercuten directamente en la composición de la microbiota respiratoria. El flujo de aire, moco y microorganismos en el aparato respiratorio es bidireccional. Además, las condiciones de temperatura cambian progresivamente desde la temperatura ambiente que existe en el punto de inhalación, hasta la corporal en los alveolos (Dickson & Huffnagle 2015). Por ello, la microbiota respiratoria es dinámica, cambia a lo largo del tracto respiratorio, y su composición varía a lo largo del tiempo (García-Rodríguez & Fresnadillo Martínez 2002).

La colonización de las vías superiores en individuos sanos es asintomática y confiere una barrera de defensa frente a patógenos que deben competir por colonizar el mismo nicho. Esta microbiota está integrada por microorganismos comensales y patógenos oportunistas. Si bien el árbol broncoalveolar y los pulmones se han considerado tradicionalmente ambientes estériles, el árbol broncoalveolar presenta una microbiota compuesta por gran variedad de bacterias, hongos y virus, y solo el 1% de ella crece en cultivo (Monsó 2017). La microbiota pulmonar de individuos sanos se alimenta principalmente de la oral, cuyos filos principales son *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, cuyos géneros patogénicos como *Haemophilus* están menormente representados (Charlson *et al.* 2011). La composición de la microbiota pulmonar está determinada por el balance de tres determinantes ecológicos: (i) la inmigración microbiana (inhalación de bacterias y dispersión mucociliar), (ii) la eliminación de microorganismos (mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa), y (iii) condiciones de crecimiento (disponibilidad de nutrientes y O₂, pH, competición con microbiota local) (**Figura 2**). Cualquier cambio en la microbiota pulmonar se debe a una perturbación en uno o más de estos factores (Dickson *et al.* 2014). Se emplea el término disbiosis para referirse a cambios en la microbiota normal que tienen consecuencias negativas para la fisiología del huésped. En determinadas ocasiones, se produce disbiosis pulmonar en la que patógenos oportunistas del tracto respiratorio superior acceden al árbol broncoalveolar, estableciendo allí su nicho y causando infecciones agudas y/o crónicas, así como episodios de empeoramiento de la enfermedad, llamados exacerbaciones. Ejemplos de esta disbiosis pulmonar acontecen en patologías respiratorias asociadas al tabaquismo como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o la bronquitis crónica. Además, estudios recientes apuntan a que la microbiota del esputo de

pacientes EPOC está relacionada con el estado y la progresión de la enfermedad (Braeken *et al.* 2016).

El término microbioma se refiere a los genomas del conjunto de microorganismos pertenecientes a la microbiota de un individuo y que, integrados con el propio genoma del organismo, dan lugar al hologenoma. El estudio del hologenoma respiratorio humano y los cambios que experimenta, principalmente en episodios de enfermedad, son aspectos innovadores de la medicina evolutiva para entender los mecanismos de patogénesis microbiana y facilitar el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas frente a infecciones respiratorias por patógenos profesionales y oportunistas.



Figura 2. Determinantes del microbioma respiratorio humano. El balance entre el acceso de nuevos microorganismos a la mucosa respiratoria y su eliminación por los mecanismos inmunes del sistema respiratorio determinan el microbioma respiratorio, que se ve puede ver alterado por la aparición y/o progresión de una patología pulmonar.

3. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA

Las enfermedades respiratorias crónicas y las infecciones respiratorias se sitúan en las primeras posiciones en estudios de prevalencia, morbilidad y mortalidad mundiales, debido a su alto índice de mortalidad y gran impacto socioeconómico (Mathers *et al.* 2006). Por ello, la investigación de las bases biológicas de este tipo de enfermedades es una importante prioridad de la investigación biomédica, para poder así, identificar y explotar nuevas dianas terapéuticas que contribuyan a preservar la salud y el estado de bienestar de la sociedad en su conjunto.

La EPOC se caracteriza por una obstrucción progresiva e irreversible de las vías respiratorias, producida por una inflamación crónica y por cambios en la estructura pulmonar (enfisema y fibrosis). Los síntomas principales de la EPOC son la tos crónica y la producción de esputo debida a la hipersecreción de moco (Celli *et al.* 2004). Junto a la fase estable y progresiva de la enfermedad, los pacientes EPOC más severos experimentan episodios ocasionales de exacerbación. Las exacerbaciones de la EPOC son periodos de empeoramiento agudo de la sintomatología respiratoria que pueden cursar con afectaciones sistémicas como fiebre y fatiga. Estos episodios tienen duración variable, entre horas y días, y repercuten directamente en el agravamiento de la enfermedad, ya que el paciente no llega a experimentar una recuperación total (Seemungal *et al.* 2000).

Actualmente, la EPOC es la cuarta causa de muerte a nivel mundial, y presenta una tendencia en aumento; la Organización Mundial de la Salud predice que será la tercera causa de

muerte a nivel mundial en 2020 (Murray & Lopez 1997). En España, de cada 100.000 habitantes, 449 hombres y 238 mujeres mueren a causa de EPOC.

4. PAPEL DE LA INFECCIÓN BACTERIANA EN EL PROGRESO DE LA EPOC

El avance de la EPOC, así como factores asociados como el tabaquismo, provocan alteraciones en la morfología e inmunidad de la mucosa respiratoria (Smaldone *et al.* 1993). Ambos fenómenos generan inflamación crónica y hacen accesible el árbol broncoalveolar a patógenos (bacterianos y víricos) que causan infección, individualmente o en co-infección, y a contaminantes ambientales (Vogelmeier *et al.* 2017). Estos microorganismos patógenos y oportunistas se convierten en colonizadores persistentes del tracto respiratorio inferior de este tipo de pacientes crónicos.

La amplificación del daño pulmonar contribuye al deterioro progresivo e irreversible del sistema respiratorio, que a su vez empeora la inmunidad del individuo y facilita aún más el acceso de nuevos patógenos al pulmón. Este proceso cíclico se conoce como hipótesis del “círculo vicioso” y explica el modo en el que la enfermedad entra en un bucle sin fin (Figura 3). Una vez que se produce el establecimiento de microorganismos colonizadores en el pulmón, estos persisten disminuyendo la función mucociliar, y las propiedades viscoelásticas del epitelio, y produciendo hipersecreción de moco. Los neutrófilos activados liberan al medio proteasas que degradan elementos solubles de la inmunidad celular como sus componentes del surfactante pulmonar e inmunoglobulinas (Betsuyaku *et al.* 2004, Pilette *et al.* 2003). Además, la capacidad fagocítica de los fagocitos profesionales disminuye, facilitando la llegada de nuevos microorganismos a las vías respiratorias bajas de forma continua e indefinida. La colonización bacteriana de este nicho provoca la amplificación de la respuesta inflamatoria debido al reconocimiento de PAMPs. Del mismo modo, los productos bacterianos contribuyen a la respuesta inflamatoria y consiguiente reclutamiento de fagocitos profesionales que amplifican el daño epitelial ya producido. Esta dinámica repercute, en última instancia, en una elevada inflamación crónica y una colonización persistente de los pulmones por patógenos y microorganismos oportunistas, contribuyendo a la progresión irreversible de la enfermedad (Rao *et al.* 1999, Sethi & Murphy 2008).

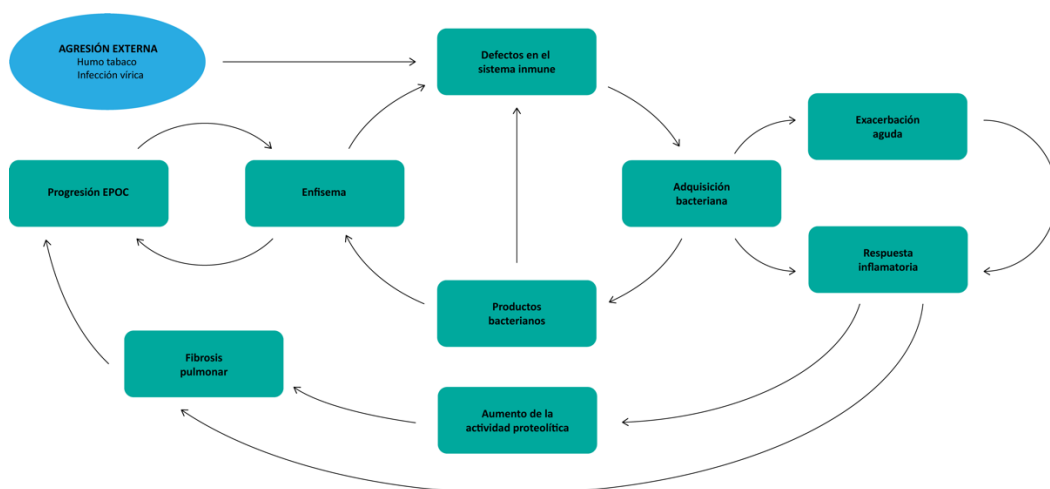


Figura 3. Hipótesis del círculo vicioso en la progresión de la EPOC.

La inflamación e infección crónica juegan un papel importante tanto en la fase estable, como en las exacerbaciones de la EPOC. La causa más común de exacerbación, representando el 55% de los casos, es la infección bacteriana. Entre los microorganismos involucrados en las exacerbaciones, la bacteria más comúnmente encontrada es *Haemophilus influenzae*, en un 20-30% de los casos, seguida de *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Santos *et al.* 2016). Los mecanismos de pato-adaptación de *H. influenzae* en el pulmón EPOC han sido objeto de estudio en este trabajo.

5. CARACTERÍSTICAS GENERALES *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae, del griego, “amante de la sangre”, es una bacteria a Gram-negativa con morfología cocobacilar pleiomorfa y metabolismo anaerobio facultativo. *H. influenzae* pertenece al filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pasteurellales*, familia *Pasteurellaceae*, género *Haemophilus*. Es un microorganismo aislado exclusivamente en el aparato respiratorio humano, no se ha identificado en otras fuentes, animales o ambientales. *H. influenzae* requiere factores de crecimiento presentes en la sangre, específicamente, una fuente de grupos hemo (factor X) y nicotidamida adenin dinucleótido (factor V) (Agrawal & Murphy 2011).

Las cepas de *H. influenzae* se clasifican en 7 biovares en base a 3 características bioquímicas: (i) producción de indol, (ii) actividad ureasa, y (iii) actividad ornítica decarboxilasa. Además, se distinguen 6 serotipos (a-f), según la reactividad del polisacárido capsular (Pittman 1931). Las cepas no capsuladas se denominan *H. influenzae* no tipificable (HiNT). Las cepas capsuladas presentan poca diversidad genética, mientras que la población de HiNT es mayor y heterogénea. Mediante el análisis del gen *capB*, implicado en la síntesis de la cápsula, se encontró una proporción pequeña de cepas HiNT que lo conservan, sugiriendo un antecesor capsulado. No obstante, la mayoría de cepas HiNT no poseen ancestros capsulados (Rao *et al.* 1999).

H. influenzae forma parte de la microbiota nasofaríngea humana. Se transmite por inhalación a través de aerosoles o por contacto directo con secreciones respiratorias. *H. influenzae* es aislado en 40-80% de los individuos sanos, con mayor frecuencia en niños que en adultos. Además, un individuo puede estar colonizado simultáneamente por varias cepas distintas que cambian a lo largo de su vida (Murphy *et al.* 1999). La proporción de cepas capsuladas en la microbiota normal es baja, representando un 2-7% del total de cepas *H. influenzae*. Esta bacteria presenta una dualidad colonizador-patógeno, favorecida por cambios en la inmunidad pulmonar del hospedador y/o la capacidad adaptativa de *H. influenzae*. De este modo, *H. influenzae* alcanza el árbol broncoalveolar y se establece en el nuevo nicho como patógeno oportunista en individuos con la inmunidad pulmonar comprometida (Foxwell *et al.* 1998).

H. influenzae serotipo b causa infecciones invasivas en niños y neumonía aguda (Rao *et al.* 1999). El desarrollo de una vacuna basada en la capsula de *H. influenzae* serotipo b ha disminuido las infecciones causadas por este patógeno hasta su casi erradicación (Peltola 2000). Actualmente, HiNT es el patógeno de esta especie con mayor relevancia clínica.

HiNT es agente etiológico de infecciones agudas como otitis media, sinusitis, bronquitis, neumonía y conjuntivitis. Además, actúa como patógeno oportunista del tracto respiratorio inferior en pacientes EPOC, fibrosis quística o bronquitis crónica, causando infección persistente, y agravando el curso de la enfermedad respiratoria subyacente (Sethi & Murphy 2008). En EPOC, la infección por HiNT contribuye a la progresión irreversible de la enfermedad. El análisis de cepas de HiNT aisladas de muestras de pacientes EPOC mostró una co-existencia de distintas

cepas, las cuales persisten y son reaisladas de nuevo a lo largo del curso de la enfermedad, sugiriendo una respuesta inmune inefectiva en cuanto a la eliminación del patógeno.

6. PATO-ADAPTACIÓN EVOLUTIVA DE HiNT EN EL PULMÓN EPOC

La prevención y control de la transmisión de enfermedades infecciosas crónicas es un aspecto prioritario de las políticas sanitarias. Por ello, un modelado de la dinámica de infección y de los mecanismos moleculares de adaptación de los agentes causantes de las mismas resulta crucial.

Las vías aéreas del paciente EPOC son un ecosistema complejo y dinámico. El tejido enfisematoso se desarrolla fundamentalmente en las regiones superiores de los lóbulos pulmonares, reduciéndose la superficie aérea donde se produce el intercambio gaseoso. Esto se traduce en una menor disponibilidad de oxígeno, a la que HiNT hace frente por ser un organismo anaerobio facultativo. Además, la inflamación crónica resultante de la infección persistente reduce el pH local, creando un ambiente ácido en el que la bacteria debe sobrevivir (Marsland & Gollwitzer 2014). Por otra parte, el exposoma (totalidad de exposiciones ambientales) del paciente EPOC integra el humo del tabaco, y el tratamiento recibido, lo que constituyen dos mecanismos antropogénicos de selección natural de tipo fuerte y direccional, que se suman a presión inmunitaria del hospedador (J. Garmendia *et al.* 2012).

El humo del tabaco es una mezcla química compleja formada por más de 4.700 compuestos diferentes que alcanzan y se depositan en el tracto respiratorio, causando un elevado estrés oxidativo. Entre estas moléculas, existen compuestos aromáticos que pueden constituirse como fuentes de carbono alternativas, generando una potencial ventaja metabólica en este nicho hostil (Borgerding & Klus 2005).

El paciente EPOC recibe tratamiento antibiótico intermitente, anti-inflamatorio y dual antibiótico/anti-inflamatorio (Vogelmeier *et al.* 2017). No obstante, el presente régimen terapéutico tiene limitaciones. Por un lado, el uso de antibióticos conlleva la generación y transmisión de resistencias, mientras que la eficacia de los corticoides es limitada debido a la generación de insensibilidades a este tipo de fármacos en pacientes que los toman de forma crónica (Carlet *et al.* 2014, Barnes 2013). Por otro lado, HiNT es un patógeno intracelular facultativo, lo que puede ser clave para provocar la infección crónica, persistente y recurrente que se observa en la EPOC (Morey *et al.* 2011). La persistencia intracelular de HiNT en el epitelio respiratorio genera un nicho donde el patógeno está protegido de fármacos que no atraviesan las membranas celulares, por lo que numerosas de terapias no acceden al microorganismo (J. Garmendia *et al.* 2012).

Por tanto, es previsible que HiNT esté obligado a desarrollar modificaciones pato-adaptativas al invadir de forma persistente el nicho que constituye el pulmón enfisematoso. Para ello, la bacteria presenta un amplio arsenal genético y metabólico que puede favorecer su evolución adaptativa en el pulmón del paciente EPOC.

6.1. Variabilidad genética de *H. influenzae*

La cepa de *H. influenzae* RdKW20 fue el primer organismo de vida libre libre cuyo genoma completo fue secuenciado. El tamaño de su genoma es de 1.830.137 pares de bases, y contiene 1.743 genes anotados (Fleischmann *et al.* 1995). Multitud de análisis genéticos posteriores indican una elevada diversidad genética en cepas no tipificables, con implicaciones en la adaptación y patogénesis de este microorganismo oportunista (Staples *et al.* 2017, Price *et al.* 2015).

La gran diversidad genética en *H. influenzae* que se debe a:

- (i) *H. influenzae* es una bacteria competente natural. La bacteria es capaz de incorporar a su genoma ADN lineal exógeno (Maughan & Redfield 2009).
- (ii) *H. influenzae* presenta una tasa elevada de mutaciones. En su genoma, aparecen numerosos polimorfismos, mayormente, en genes que codifican proteínas de superficie, aumentando la variabilidad antigénica de la bacteria (Duim *et al.* 1997, Poole *et al.* 2013, Weiser *et al.* 1997).
- (iii) *H. influenzae* regula la expresión de algunos genes mediante variación de fase. La secuenciación del genoma de RdKW20 reveló una alta frecuencia de repeticiones de secuencias cortas de ADN, de 1-9 nucleótidos de longitud (Simple Sequence Repeats, SSRs). Para un mismo gen, la secuencia de SSRs está conservada entre cepas, así como su posición relativa. Sin embargo, el número de SSRs varía en función de la cepa. La introducción de cambios en el número de repeticiones es reversible, determina cambios en los niveles de expresión si los SSRs se localizan en el promotor, o cambios en el marco traduccional de lectura, si se encuentran en la región codificante del gen correspondiente (Hood *et al.* 1996).
- (iv) *H. influenzae* presenta rasgos de hipermutación asociados a su persistencia (Watson *et al.* 2004).

La gran diversidad y variabilidad genética en HiNT permite que este patógeno oportunista se establezca de forma persistente en nichos nuevos distintos al habitual, causando infección e inflamación prolongadas, como ocurre en las vías respiratorias bajas de los pacientes EPOC.

6.2. Metabolismo central de *H. influenzae*

El metabolismo central es el conjunto de rutas metabólicas y procesos físico-químicos a través de los cuales un organismo genera energía y moléculas necesarias para formar biomasa (Noor *et al.* 2010). El metabolismo central de carbohidratos bacteriano es una red interconectada, robusta y regulada a distintos niveles, compuesta por la glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato, el ciclo de Krebs y las reacciones fermentativas.

La información genómica disponible indica que HiNT tiene el repertorio completo de enzimas implicadas en glicólisis y ruta de las pentosas fosfato, y un ciclo de Krebs incompleto propio de bacterias fermentativas. El ciclo de Krebs en *H. influenzae* presenta minimización funcional extrema en la que la mayoría de enzimas de la rama oxidativa están ausentes (Tatusov *et al.* 1996). Los ciclos de Krebs incompletos son propios de bacterias fermentadoras. No obstante, HiNT presenta un gran repertorio de dehidrogenasas y reductasas. Estas son necesarias para que la bacteria haga frente al desequilibrio redox producido por una sobreproducción de NAD^+ , NADP^+ y FAD^+ . HiNT utiliza el poder oxidante generado, para oxidar otros compuestos mediante reacciones propias de rutas aerobias, utilizando O_2 , nitrato, nitrito, dimetilsulfóxido (DMSO), y N-óxido de Trimetilamina (TMAO), como aceptor final de electrones (**Figura 4**). De este modo, HiNT presenta un especializado metabolismo de fermentación asistida por respiración, lo que le otorga versatilidad metabólica para adaptarse y persistir en el nicho de infección (Othman *et al.* 2014).

Debido a la fisiopatología de la EPOC, HiNT consigue acceder al árbol broncoalveolar del huésped. Este nuevo nicho presenta concentraciones disminuidas de oxígeno. Al tratarse del tracto respiratorio inferior, el alcance del oxígeno es menor que en el superior y la destrucción tisular derivada de la enfermedad hace que la disponibilidad de oxígeno sea también menor en el tejido enfisematoso y fibrótico, que en la mucosa de la nasofaringe. Por otra parte,

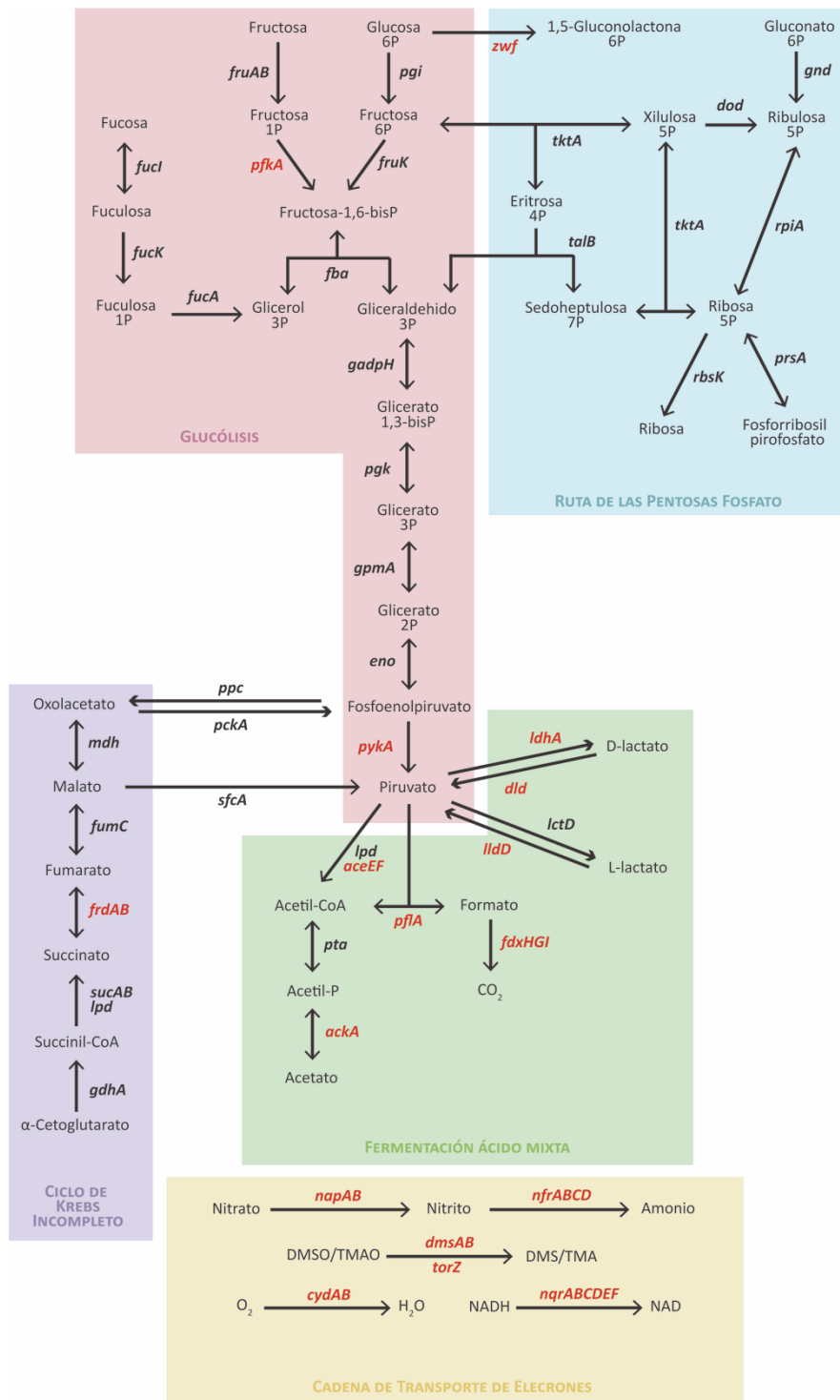


Figura 4. Metabolismo central de carbohidratos de *H. influenzae*. Representación esquemática del metabolismo central de *H. influenzae*, con los metabolitos y los genes que codifican las enzimas que lo componen. Se muestran las reacciones correspondientes a la **glucólisis**, **ruta de las pentosas fosfato**, **fermentación ácido mixta**, **ciclo de Krebs incompleto** y **cadena de transporte electrónico**. Se marcan en rojo los genes que codifican las principales enzimas que tienen relevancia en este trabajo; *aceF*: complejo piruvato deshidrogenasa; *ackA*: acetato quinasa; *cydAB*: citocromo bd oxidasa; *dld*: D-lactato deshidrogenasa; *dmsA*: DMSO reductasa; *fdxG*: formato deshidrogenasa; *frdA*: fumarato reductasa; *ldhA*: D-acetato DH NAD⁺-dependiente; *lldD*: L-lactato deshidrogenasa; *napA*: nitrato reductasa; *nqrB*: NADH deshidrogenasa; *nrfA*: nitrito reductasa; *pfkA*: 6-fosfofructoquinasa; *pflA*: piruvato formato liasa; *pykA*: piruvato quinasa; *torZ*: TMAO reductasa; *zwf*: glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa.

diversas evidencias sugieren que, en su estado intracelular, la bacteria se localiza en compartimentos subcelulares de naturaleza ácida, en un estado no proliferativo donde se encuentra metabólicamente activa (Morey *et al.* 2011). Si bien no ha sido demostrado

experimentalmente, las condiciones de oxigenación de estos compartimentos también puede ser limitada. La variabilidad en la concentración de O₂ de los nichos ocupados por HiNT sugiere que la versatilidad metabólica de esta bacteria puede ser un rasgo importante de su adaptación al aparato respiratorio humano. Este aspecto ha sido considerado en este trabajo (**Objetivo 1**).

6.3. Aspectos moleculares de virulencia y patogénesis de HiNT

La interacción huésped-patógeno de HiNT empieza en las vías aéreas superiores, en las que se asienta como microorganismo comensal asintomático, proceso que implica su establecimiento en la mucosa nasofaríngea y la evasión del sistema inmune del hospedador. En determinadas circunstancias asociadas a enfermedades respiratorias crónicas, HiNT accede a los pulmones, donde establece nuevo nicho patogénico y estimula la inflamación crónica en una nueva etapa de infección sintomática.

Los factores de virulencia son elementos moleculares de la fisiología bacteriana que dotan a la bacteria de la capacidad para colonizar y provocar infección, resultando determinantes para su patogénesis (Rao *et al.* 1999). A continuación se detallan algunos de los mecanismos más relevantes en la patogénesis de HiNT.

6.3.1. Lipooligosacárido (LOS) de HiNT

La envoltura celular de las bacterias Gram negativas está compuesta por la membrana interna, en contacto con el citosol, la membrana externa, expuesta al exterior, y el espacio periplásmico, que constituye el área entre ambas membranas. La membrana externa está formada por una bicapa lipídica de fosfolípidos con moléculas de lipopolisacárido (LPS) expuestas hacia la cara externa (Kita & Nikaido 1973).

El LPS bacteriano es un glucolípido complejo, y cada molécula de LPS está compuesta por el lípido A, un núcleo oligosacárido y el antígeno O. El LPS de *H. influenzae* no presenta antígeno O, por lo que se denomina lipooligosacárido (LOS) (**Figura 5**). En este caso, el lípido A, cuya función es la de anclaje a la bicapa lipídica, está formado por una diglucosamina unida a ácidos grasos. El número, longitud y posición de los ácidos grasos varía entre cepas (Mikhail *et al.* 2005). El oligosacárido está unido al lípido A y se divide a su vez en núcleo interno y externo. El núcleo interno está formado por ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosónico (Kdo), en contacto con el lípido A, y tres heptosas, que unen el Kdo y el núcleo externo, y están frecuentemente fosforiladas. Estas heptosas, a su vez pueden presentar unidos oligosacáridos, que a su vez son susceptibles de contener decoraciones de naturaleza glucídica o no, y que forman el núcleo externo (Morey *et al.* 2013).

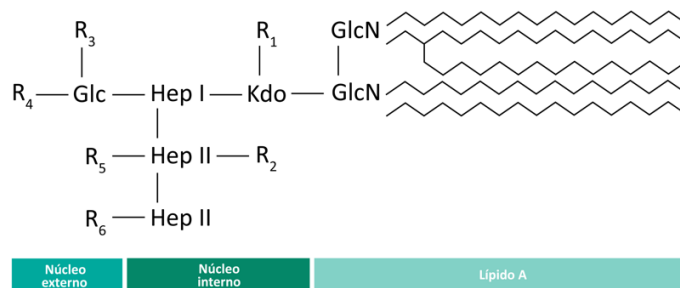


Figura 5. Estructura conservada de la molécula de LOS de *H. influenzae*. Glc: glucosa; GlcN: glucosamina; Hep: heptosa; Kdo: ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosónico; R: residuo variable.

En *H. influenzae*, se ha demostrado que la molécula de LOS participa en diversos aspectos de la relación huésped-patógeno (Schweda *et al.* 2007, Choi *et al.* 2014). El LOS de HiNT presenta

variabilidad entre cepas e incluso dentro de una misma cepa. La heterogeneidad entre cepas depende de la presencia/ausencia de los genes involucrados con su biosíntesis y de los polimorfismos presentes en ellos. La variabilidad dentro de una misma cepa depende, en mayor parte, de la longitud y composición variables de las cadenas de oligosacáridos del núcleo externo. Además, la molécula de LOS puede sufrir diversas modificaciones químicas, entre ellas, la adición de una molécula de fosforilcolina (PCho). La PCho está anclada a la primera glucosa de una de las 3 hexosas del núcleo interno del LOS, generalmente en la primera (Morey *et al.* 2013).

6.3.1.1. Papel de la fosforilcolina (PCho) en la virulencia de HiNT

La molécula de colina, en forma de fosfatidilcolina, es el principal componente de la membrana plasmática eucariota, representando un 30-60% de la masa total de fosfolípidos de la célula. Aunque su presencia es poco frecuente en procariotas, *H. influenzae* y otras bacterias que residen predominantemente en la mucosa del tracto respiratorio humano decoran su superficie con PCho (Fan *et al.* 2001, Weiser *et al.* 1997).

H. influenzae carece de los genes involucrados en la de biosíntesis *de novo* de colina, por lo que incorpora desde el medio extracelular colina en forma libre, para fosforilarla e integrarla en la molécula del LOS, decorando su superficie celular (Fan *et al.* 2001). El operón *lic1ABCD* es responsable de la expresión de PCho en la superficie de HiNT; el gen *licA* codifica una colina kinasa que fosforila la colina y la transforma en PCho, *licB* codifica un transportador de colina que se encarga de incorporar colina desde el medio, *licC* codifica una pirofosfatasa que activa la molécula de PCho, y *licD* codifica una difosfonucleosido transferasa que juega un papel importante en la transferencia de PCho a la molécula del LOS. La expresión de los genes de este operón está controlada por variación de fase, permitiendo a la bacteria variar la cantidad de PCho de su superficie celular, añadiendo o eliminando repeticiones del tetranucleótido 5'CAAT3' aguas abajo del codón de inicio de la traducción del gen *licA*.

H. influenzae posee un mecanismo complementario de obtención de colina. La glicerofosfodiéster fosfodiésterasa GlpQ se encarga de hidrolizar glicerofosfolípidos presentes en las células del huésped. En ellas, existe un reciclaje continuo de los glicerofosfolípidos de la membrana. Uno de los productos principales de la degradación de estas moléculas es la glicerolfosforilcolina (GPC), que contiene en su estructura una molécula de PCho. *H. influenzae*, a través de la acción de GlpQ, hidroliza GPC y libera al medio colina en forma libre. La colina liberada por la acción hidrolítica de GlpQ es captada, fosforilada e integrada en el LOS mediante el mecanismo ya descrito coordinado por el operón *lic1ABCD* (Fan *et al.* 2001). Otra molécula capaz de ser hidrolizada por GlpQ es el factor activador de plaquetas (*Platelet Activating Factor*, PAF), un mediador pro-inflamatorio del sistema inmune del hospedador que integra en su estructura una molécula de colina (Figura 6).

La presencia de PCho en la molécula de LOS de *H. influenzae* constituye un mecanismo de mimetismo molecular. El mimetismo molecular es una estrategia utilizada por microorganismos patógenos que consiste en expresar en su superficie motivos similares a los presentes en células del huésped. De este modo, la bacteria evade el sistema inmune del huésped en base a su dificultad para reconocer la bacteria como extraña. Además, la decoración de la superficie de *H. influenzae* con PCho permite a la bacteria interactuar con las células del huésped que expresan el receptor PAF, como mecanismo de adhesión e invasión. Al interactuar *H. influenzae* a través de su LOS con el receptor PAF, se inhibe la relación receptor PAF:PAF que activa cascadas de señalización de numerosos procesos inmunes. Por otro lado, si GlpQ hidroliza PAF para obtener colina y decorar la superficie bacteriana con PCho, consigue a su vez disminuir la cantidad de este mediador inflamatorio en el lugar de la infección, disminuyendo la inflamación y por tanto, la respuesta inmune del hospedador en beneficio propio (Hergott *et al.* 2015).

PCho es un importante factor de virulencia de *H. influenzae*, implicado en numerosos aspectos relacionados con su patogénesis. PCho facilita la formación de agregados de tipo *biofilm* (Hong *et al.* 2007), favoreciendo la persistencia de la bacteria en el nicho donde produce infección. Además, está involucrado en la resistencia a péptidos antimicrobianos (Lysenko *et al.* 2000b) y la susceptibilidad a la muerte mediada por suero, activando la vía clásica del complemento mediante interacción con la proteína C-reactiva (Lysenko *et al.* 2000a, Lysenko *et al.* 2000b). A estos factores se suman los derivados del mimetismo molecular, previamente descritos.

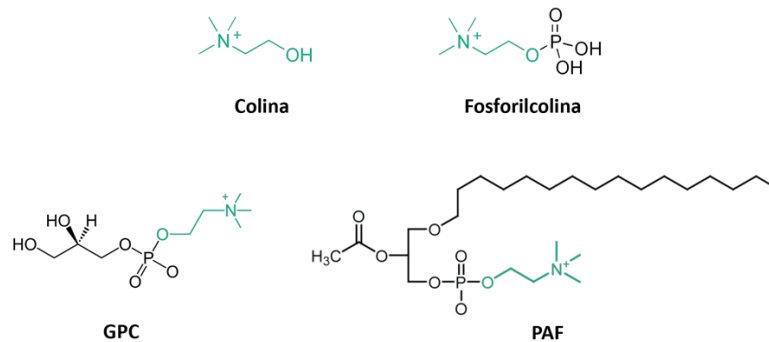


Figura 6. Estructura química de la colina, fosforilcolina, glicerolfosforilcolina (GPC) y el factor activador de plaquetas (PAF). Se resalta en **color** la molécula de colina.

Además, GpQ presenta un papel dual en la infección respiratoria por HiNT: (i) participa en la decoración de la superficie bacteriana con PCho, interaccionando e invadiendo células del sistema inmune a través del receptor PAF, mientras toma como fuente de colina la propia molécula PAF, (ii) hidroliza PAF y disminuye su concentración en el lugar de infección, atenuando la respuesta inflamatoria del huésped. Esta acción dual como factor de virulencia e inmunomodulador, convierte a GpQ en una diana terapéutica explotable para la búsqueda de inhibidores de su actividad fosfodiesterasa. Este aspecto ha sido abordado en este trabajo (**Objetivo 3**).

6.3.2. Infección del epitelio respiratorio humano por HiNT

6.3.2.1. Adhesión de HiNT al epitelio respiratorio

El inicio de la infección por HiNT implica el establecimiento de la bacteria en la mucosa respiratoria. En este contexto, HiNT presenta un arsenal de adhesinas, moléculas que facilitan el reconocimiento de estructuras celulares del huésped y estabilizan la interacción del patógeno con el epitelio respiratorio y la matriz extracelular (**Tabla 1**). Generalmente, son moléculas con una alta variabilidad en HiNT, ya que no todas las cepas de HiNT presentan en su genoma los genes correspondientes a cada adhesina, y existe variabilidad alélica entre genes y aislados. Además, la expresión de algunas adhesinas está regulada por variación de fase (Ahearn *et al.* 2017). Se trata, por tanto, de un conjunto heterogéneo de moléculas que intervienen en la adhesión de HiNT al epitelio respiratorio humano.

Tabla 1. Principales adhesinas e invasinas de *H. influenzae*.

Adhesina/Invasina	Nombre completo	Adhesión
Hap	Proteína de adherencia y penetración de <i>H. influenzae</i>	Células epiteliales, fibronectina, laminina, colágeno
Hmw1A	Proteína de alto peso molecular 1	Células epiteliales
Hmw2A	Proteína de alto peso molecular 2	Células epiteliales
Hia	Adhesina de <i>H. influenzae</i>	Células epiteliales
HifA	Fimbria	Mucina
P2	Proteína 2	Mucina, receptor de laminina
P4	Proteína 4	Vitronectina, fibronectina
P5	Proteína 5	Mucina, receptor CEACAM-A, molécula ICAM-1
PD	Proteína D	Células mononucleares
PE	Proteína E	Vitronectina, células epiteliales
PF	Proteína F	Laminina
PCho	Fosfatidilcolina	Receptor PAF
PiIA	Pili tipo IV	Células epiteliales, molécula ICAM-1

6.3.2.1.1. Hap

Hap es una proteína autotransportadora de *H. influenzae* que actúa como adhesina. Presenta homología con proteasas de tipo serina IgA1 de *H. influenzae* que proteolizan inmunoglobulinas humanas (Mehta *et al.* 1973, Plaut *et al.* 1975). Hap es sintetizada como un precursor proteico que contiene un péptido señal en el extremo N-terminal, un dominio proteasa (Hap_s) y un dominio intermembrana (Hap_β) en el extremo C-terminal. El péptido señal es responsable de que la proteína se exporte del citoplasma al espacio periplásmico. Una vez allí, el dominio Hap_β, que posee estructura de barril β, se inserta en la membrana externa y permite la translocación del dominio Hap_s a la superficie bacteriana, donde se autoproteoliza, liberándose y quedando Hap_β embebido en la membrana externa (Spahich *et al.* 2011).

La proteína de Hap, con el dominio Hap_s asociado a Hap_β en la membrana externa, promueve la adhesión de HiNT a células epiteliales. La retención de Hap_s en la superficie bacteriana es responsable de eventos de agregación entre bacterias y formación de microcolonias en la superficie epitelial (Hendrixson & St Geme 1998). De este modo, durante estadios iniciales de la infección por HiNT, la autoproteólisis de Hap se inhibe como mecanismo de adhesión. Contrariamente, cuando Hap se autoproteoliza, el dominio Hap_s se libera de la superficie, permitiendo a las bacterias individualizarse, diseminarse y migrar a nuevos nichos susceptibles de infección. Por otro lado, la proteólisis de Hap es también un mecanismo de evasión de elementos solubles de la inmunidad del huésped.

6.3.2.1.2. HmwA

HiNT posee dos proteínas de alto peso molecular, Hmw1A y Hmw2A (*High Molecular Weight protein*) que comparten 71% identidad y 80% similitud en sus secuencias aminoacídicas (Barenkamp & Leininger 1992). Estas proteínas, de 125 y 120 kDa respectivamente, se han

encontrado en aproximadamente 75% de las cepas de HiNT analizadas. En contraposición, no se han identificado estas adhesinas en ninguna cepa capsulada de *H. influenzae* (Rao *et al.* 1999).

Hmw1A y Hmw2A están codificadas por los operones *hmw1ABC* y *hmw2ABC*, respectivamente, que se encuentran en *loci* diferenciados del genoma de HiNT y que tienen distintas especificidades adherentes, siendo Hmw1 esencial y Hmw2 dispensable (Hultgren *et al.* 1993, St Geme *et al.* 1993). Los genes *hmw1A* y *hmw2A* codifican las proteínas Hmw1A y Hmw2A, respectivamente, y se distinguen entre sí por el dominio de unión a receptores eucariotas glicoproteicos (Mell *et al.* 2016). Estos genes están flanqueados aguas abajo por los genes *hmwB* y *hmwC*, ambos con gran porcentaje de homología e identidad (99% y 96%, respectivamente), siendo intercambiables funcionalmente entre los operones *hmw1ABC* y *hmw2ABC*. Hmw1A y Hmw2A se localizan en la membrana externa de la bacteria. Hmw1B y Hmw2B se encargan de externalizar Hmw1A y Hmw2A a través del periplasma mediante el sistema de secreción Sec (Barenkamp & St Geme 1994). Hmw1C y Hmw2C participan en la estabilización de Hmw1A y Hmw2A en la membrana externa mediante su glicosilación (Grass *et al.* 2010). Se han identificado eventos de variación de fase en el promotor de estos operones, como mecanismo de regulación de su expresión. El aumento de repeticiones del heptanucleótido 5'ATCTTTC3' en los promotores de los operones *hmw1ABC* y *hmw2ABC* se asocia a una reducción de la cantidad de Hmw1A y Hmw2A, lo que constituye una ventaja evolutiva para HiNT, ya que es un mecanismo de evasión de la defensa inmune adaptativa del huésped, y se relaciona con una mayor persistencia de este patógeno (Dawid *et al.* 1999, Cholon *et al.* 2008).

6.3.2.2. Invasión del epitelio respiratorio por HiNT

HiNT es un microorganismo intracelular facultativo. Su localización intracelular actúa como nicho protector con condiciones ambientales distintas a las extracelulares, a las que HiNT debe hacer frente mediante mecanismos de adaptación evolutiva (Garmendia *et al.* 2012, Clementi & Murphy 2011). El modelo de infección del epitelio respiratorio humano por HiNT presenta un conjunto de etapas diferenciadas (**Figura 7**):

- (i) Adhesión: Las bacterias se adhieren a la superficie epitelial mediante un repertorio de adhesinas que interaccionan con receptores eucariotas.
- (ii) Agregación y formación de microcolonias. Proceso en el cual intervienen Hap, Hmw1 y Hmw2.
- (iii) Invasión bacteriana: Se estimulan cambios en el citoesqueleto de la célula huésped que favorecen la internalización de HiNT.
- (iv) Localización intracelular no proliferativa: HiNT co-localiza inicialmente en compartimentos de tipo endosoma temprano que maduran a compartimentos ácidos de tipo endosoma tardío (Morey *et al.* 2011).

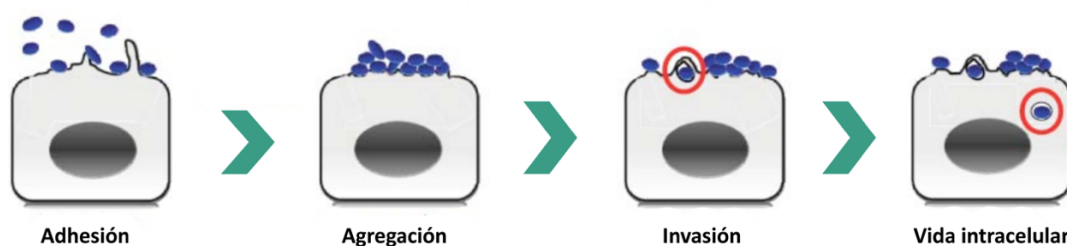


Figura 7. Modelo de infección del epitelio respiratorio humano por HiNT. Representación gráfica de las cuatro etapas del modelo de infección de HiNT: (i) adhesión bacteriana a la superficie celular, proceso mediado por un repertorio de adhesinas bacterianas y receptores eucariotas; (ii) agregación bacteriana y formación de microcolonias; (iii) invasión bacteriana; (iv) vida intracelular no proliferativa. En círculos rojos se marcan los procesos de internalización y compartimentalización intracelular de HiNT en células del epitelio respiratorio.

Se ha demostrado con éxito que la introducción del operón *hmw1ABC* en cepas HiNT poco invasoras resulta en transformantes que muestran altos niveles de autoagregación, adherencia e invasión epitelial (St Geme *et al.* 1993). Así, trabajo reciente del grupo de investigación ha identificado alelos de Hmw1A como determinantes de la infección de células epiteliales del aparato respiratorio por HiNT. Estas evidencias apuntan a un posible papel de Hmw1 como invasina, no sólo aumentando los índices de adhesión, sino también proporcionando un mecanismo de entrada bacteriana a las células eucariotas mediante la formación de agregados bacterianos, que se traduce en la aparición de un fenotipo hiperinvasor de células del epitelio respiratorio (Mell *et al.* 2016).

La invasión bacteriana dirige HiNT a un estadio intracelular de tipo reservorio que puede ser responsable de infecciones persistentes y recurrentes en los pacientes EPOC. En este estudio, se ha examinado el papel de Hap y HmwA en la progresión de la infección y en la dinámica de la vida intracelular de HiNT (**Objetivo 2**).

/H0

**HIPÓTESIS
Y OBJETIVOS**

El patógeno oportunista HiNT es comensal de la microbiota nasofaríngea humana en individuos sanos. En el contexto de enfermedades que afectan a la función pulmonar como es la EPOC, HiNT accede al árbol broncoalveolar y se establece en este nuevo nicho. La infección respiratoria por HiNT en pacientes EPOC persiste y recurre, empeorando el curso de la enfermedad y el pronóstico del paciente. El régimen terapéutico habitualmente administrado a este tipo de pacientes presenta limitaciones, por lo que surge la necesidad de explorar nuevas estrategias antimicrobianas frente a esta infección. El pulmón EPOC, por la propia fisiopatología de la enfermedad, es un ambiente hostil al que HiNT hace frente mediante mecanismos de evolución pato-adaptativa. Entender estos mecanismos de adaptación es una tarea de máxima prioridad para el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de terapias eficaces.

En base a las evidencias expuestas, se formula la siguiente hipótesis: **“HiNT se adapta a la presión ambiental, inmune y antropogénica del pulmón EPOC, adquiriendo rasgos moleculares de pato-adaptación que determinan su adaptación fenotípica a este nicho patológico”**.

Esta hipótesis ha sido abordada mediante los siguientes objetivos:

1. **Análisis de la expresión de un panel de 18 genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de azúcares de HiNT. Modulación de la expresión génica por inducción genética de desbalance metabólico y por presencia de concentraciones de O₂ variables.**
2. **Análisis de la frecuencia y características del fenotipo hiperinvasor de HiNT *in vivo*.**
3. **Análisis del papel de GlpQ durante la infección respiratoria por HiNT. Generación de herramientas para la exploración de GlpQ como diana terapéutica.**

Los resultados obtenidos se presentan en 3 apartados:

Apartado 1: Adaptación metabólica de *H. influenzae* a condiciones cambiantes de concentración de oxígeno.

Apartado 2: Caracterización del fenotipo hiperinvasor de HiNT en epitelio respiratorio humano.

Apartado 3: Análisis del papel de GlpQ durante la infección respiratoria por *H. influenzae*.

/MM

**MATERIALES
Y MÉTODOS**

1. CEPAS BACTERIANAS, MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas de *Escherichia coli* se crecieron en medio Luria-Bertani Agar (LB agar) a 37°C. Los cultivos líquidos se realizaron en el medio LB, con agitación (200 r.p.m.) a 37°C. Cuando fue necesario, se añadió ampicilina 100 µg/ml (Amp₁₀₀) y/o espectinomicina 50 µg/ml (Spec₅₀).

Las cepas de *H. influenzae* se crecieron en agar chocolate PolyViteX (agar chocolate) (Biomérieux) o en Infusión Cerebro Corazón Agar suplementado con 10 µg/ml hemina y 10 µg/ml β-nicotin adenin dinucleótido (β-NAD) (*supplemented Brain Heart Infusion Agar*, sBHI agar) (Conda). Los cultivos líquidos se realizaron en sBHI, con agitación (200 r.p.m.) a 37°C, con 5% CO₂. Alternativamente, se utilizó agar Müeller Hinton Fastidioso (MH-F agar) (Biomérieux). Cuando fue necesario, se añadió Spec₅₀.

Para cada una de las cepas utilizadas, se generó un *stock* recogiendo la biomasa bacteriana crecida en una placa del medio correspondiente, en 1 ml de TSB (Tryptone Soya Broth)-glicerol 20%, que se almacenó a -80°C. Para su empleo, las cepas se sacaron *de novo* siempre a partir de los *stocks* almacenados, nunca reaislando a partir de placas anteriores.

En el caso de HiNT, las cepas de interés se crecieron en agar chocolate durante 15 h, previo a su uso en los experimentos descritos a continuación. Para el crecimiento de pre-inóculos en matraces de 100 ml, se inocularon 2-3 colonias crecidas en agar chocolate en 10 ml de sBHI y se incubaron durante 10 h en agitación a 100 r.p.m y 37°C. Salvo excepciones, los bancos de dilución para el recuento de unidades formadoras de colonias (u.f.c.) se realizaron en tampón fosfato salino, PBS1X (*Phosphate Buffered Saline*: 145 mM NaCl; 7,7 mM NaHPO₄; 2,27 mM NaH₂PO₄, pH 7,2) y se plaquearon en de sBHI agar.

Las cepas utilizadas en el presente trabajo, así como sus características principales, se detallan en la **Tabla A1** (Anexo I).

2. CURVAS DE CRECIMIENTO DE *H. influenzae*

Se monitorizó la absorbancia (DO₆₀₀) de cultivos bacterianos a lo largo del tiempo para conocer la dinámica de crecimiento de las cepas bacterianas de interés. Para ello, se prepararon pre-inóculos (**Apartado 1**), que se emplearon para inocular 50 ml de sBHI en un matraz de 250 ml, diluyendo el pre-inóculo a DO₆₀₀ = 0,05. Se tomaron medidas de DO₆₀₀ durante 8 h, en intervalos de 1 h. Para relacionar la absorbancia con el número de bacterias viables, se realizaron diluciones seriadas de la muestra y se plaquearon en sBHI agar, cada 2 h (t=0h; t=2h; t=4h; t=6h; t=8h). El crecimiento de cada cepa fue analizado al menos en 3 ocasiones independientes (n≥3).

3. ENSAYO DE AUTOAGREGACIÓN BACTERIANA

Cepas de *H. influenzae* crecidas en agar chocolate se emplearon para generar una suspensión bacteriana en PBS1X, consistente en 35-40 ml con DO₆₀₀ = 0,5. Para ello, se utilizó un tubo tipo *Falcon* de 50 ml a modo de columna. El número de bacterias viables al inicio del ensayo se cuantificó mediante dilución seriada en PBS1X y plaqueo en sBHI agar. La columna se mantuvo en condiciones de esterilidad, a Tª ambiente, estática, sin ser perturbada al tomar muestras de la parte superior para medir DO₆₀₀ cada hora, durante un total de 5 h. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas para cada cepa analizada (n≥2).

4. INMUNODETECCIÓN DE PCho EN *H. influenzae* A PARTIR DE COLONIA (COLONY BLOT)

Este ensayo se empleó para determinar de forma cualitativa los niveles de PCho en la molécula LOS de cepas de *H. influenzae* de interés.

Las cepas bacterianas se crecieron en agar chocolate, se recogió la biomasa de las placas con PBS1X, y se realizaron diluciones seriadas que se plaquearon en sBHI agar. Tras 24 h, se seleccionaron placas con un número discreto de colonias separadas (100-300 colonias), para transferir la biomasa bacteriana a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se sometió a dos lavados consecutivos con tampón TSBB (0,5 M NaCl; 0,5% Tween-20; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) en agitación, y durante 15 min/lavado. A continuación, la membrana se incubó durante 16 h con el anticuerpo primario monoclonal TEPC-15 (ratón anti-PCho) (Sigma-Aldrich) diluído 1:10.000 en TSBB. Seguidamente, la membrana se lavó 5 veces con TSBB como se indica anteriormente, y se incubó 16 h con el anticuerpo secundario policlonal cabra anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Caltag), diluído 1:10.000 en TSBB. Por último, tras 5 lavados en TSBB, la membrana se incubó en tampón AP (100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 100 mM Tris-HCl, pH 9,5), y se reveló con 5-bromo-4-cloro-3-indofosfato (BCIP) (Sigma-Aldrich) y azul de tetrazolio (NBT) (Sigma-Aldrich), diluidos en tampón AP, durante 2-5 min. La reacción de revelado se detuvo con agua Milli-Q, y se observó que aquellas colonias cuyas bacterias están decorando su superficie con PCho generaron una señal morada.

5. INMUNODETECCIÓN DE PCho EN *H. influenzae* MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Este ensayo se empleó para determinar de forma cuantitativa los niveles de PCho en la molécula LOS de cepas de *H. influenzae* de interés.

Se prepararon pre-inóculos (**Apartado 1**), que se emplearon para inocular 40 ml de sBHI en un matraz de 250 ml, diluyendo el pre-inóculo a $DO_{600} = 0,05$. Este cultivo se creció en agitación (200 r.p.m.) a 37°C, con 5% CO₂ hasta alcanzar $DO_{600} = 0,6$. Se tomó una muestra para determinar el número de u.f.c./ml. Con el resto del cultivo, se prepararon alícuotas de 2 ml en sBHI+20% glicerol que se almacenaron a -80°C para su uso posterior. Para determinar los niveles de PCho, se utilizaron alícuotas con $\sim 10^7$ u.f.c., que fueron incubadas durante 1 h con el anticuerpo TEPC-15 diluído 1:25 en PBS1X-Tween 20 0,05%. Las muestras se lavaron dos veces con PBS1X-Tween 20 0,05%, y se incubaron con el anticuerpo secundario policlonal conejo anti-ratón conjugado con fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) (Serotec), diluído 1:300 en PBS1X-Tween 20 0,05%, durante 30 min, a 4°C y en oscuridad. Tras un lavado adicional como se describe anteriormente, las bacterias se fijaron con 50 μ l 3% paraformaldehído (PFA) (Sigma-Aldrich), mediante incubación en oscuridad a T^a ambiente durante 3 min. Se añadieron 200 μ l de PBS1X/muestra, y todo el volumen se transfirió a un tubo de citómetro. Se utilizó un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) que, mediante parámetros concretos para los detectores de dispersión frontal (*Forward Scatter*, FSC) y lateral (*Side Scatter*, SSC), analizó al menos 25.000 bacterias de forma individual (análisis *single-cell*). Los resultados se expresan en porcentaje de índice de fluorescencia relativo (*Relative percent Fluorescence Index*, RFI), y miden la proporción de bacterias PCho-positivas, así como la intensidad de esta fluorescencia (Domenech *et al.* 2013). Se realizaron al menos 3 réplicas biológicas de cada ensayo, por cuadruplicado ($n \geq 12$).

6. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Se determinó la resistencia de cepas de HiNT al péptido antimicrobiano colistina (polimixina E). La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó mediante la prueba de epsilometría (E-Test).

Las cepas de HiNT se crecieron en agar chocolate durante 15 h a 37°C con 5% CO₂, y se utilizó la biomasa para preparar una suspensión bacteriana en suero fisiológico, ajustada a DO₆₀₀ = 0,063, equivalente a 0,5 McFarland. Se utilizaron placas MH-F agar para repartir la suspensión bacteriana en su superficie con un bastoncillo estéril, depositando en el centro de la placa una tira E-test con concentraciones de colistina entre 256 y 0,016 µg/ml. Tras incubar las placas durante 24 h a 37°C con 5% CO₂, se observó el crecimiento de un césped bacteriano y la formación de un halo de inhibición en forma de elipse, que permitió determinar la CMI de cada cepa testada.

7. EXTRACCIÓN, RESTRICCIÓN Y MODIFICACIÓN DE ADN

La extracción de ADN genómico bacteriano se realizó a partir de cultivo líquido de bacterias en fase estacionaria utilizando el método descrito por Sambrook y Russell (Sambrook & Russell 2001). La extracción y purificación de ADN plásmidico se realizó a partir de bacterias en fase estacionaria crecidas en cultivo líquido utilizando los kits *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) y *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (Qiagen). Para la purificación de ADN, tanto a partir de reacción PCR (solución) como de gel de agarosa, se usó el kit *UltraClean DNA Purification Kit* (MO BIO Laboratories). Las enzimas de restricción de ADN (NEB) y las de modificación de ADN T4 ligasa (NEB) se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

En los casos donde fue necesario secuenciar ADN mediante método Sanger, se utilizó ADN lineal (20 ng/µl) o plasmídico (100 ng/µl) (STAB VIDA).

8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron con el objetivo de amplificar fragmentos específicos de ADN. Para ello, se empleó la enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific), una polimerasa termostable de gran procesividad y elevada fidelidad. La secuencia de los cebadores empleados en este trabajo se detalla en la **Tabla A3** (Anexo I). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl, como sigue: 10,8 µl agua Milli-Q; 4 µl tampón de reacción GC 5X (proporcionado por el fabricante); 1 µl MgCl₂ 50 mM; 1 µl de cada cebador 100 µM; 0,6 µl dNTPs 10 mM; 0,4 µl DMSO; 0,2 µl ADN polimerasa 2 U/µl y 1 µl ADN molde. Las condiciones de reacción fueron:

1. Desnaturalización inicial: 30 s; 98°C
2. 35 ciclos de:
 - Desnaturalización: 10 s; 98°C
 - Anillamiento: 30 s; 55°C
 - Elongación: 30 s/kb a amplificar; 72°C
3. Elongación final 10 min; 72°C

9. MÉTODOS DE TRANSFERENCIA DE MATERIAL GENÉTICO

9.1. Transformación química de *E. coli*

Este método fue empleado para generar cepas de *E. coli* quimiocompetentes, para su posterior transformación con ADN plasmídico por choque térmico. Se generaron bacterias competentes de las cepas *E. coli* TOP 10. Los plásmidos usados y generados en este trabajo se describen en la **Tabla A2** (Anexo I).

Para ello, a partir de 10 ml de cultivo bacteriano en fase estacionaria, se inoculó un matraz de 500 ml con 100 ml de LB, ajustando la turbidez del cultivo de inicio a $DO_{600} = 0,02$. Este cultivo fue incubado a 37°C en agitación (200 r.p.m.) hasta alcanzar $DO_{600} = 0,5$. El crecimiento de las bacterias se detuvo incubando el matraz en hielo durante 30 min, para a continuación recogerlas mediante centrifugación (8.000 r.p.m., 5 min, 4°C). El *pellet* generado se resuspendió en 0,5 volúmenes (respecto a los 100 ml de cultivo inicial) de Cl_2Mg 0,1 M frío. La suspensión bacteriana se centrifugó (8.000 r.p.m., 5 min, 4°C). El *pellet* se resuspendió de nuevo en 0,05 volúmenes (respecto a los 100 ml de cultivo inicial) de Cl_2Ca 0,1 M frío. Las bacterias se incubaron en hielo durante 2 h. Seguidamente, se añadió glicerol 100% a concentración final 10-20%, y se realizaron alícuotas de 200 μ l, almacenadas de inmediato a -80°C para su posterior uso.

Para transformar bacterias quimiocompetentes, se utilizó ADN plasmídico. Para ello, una alícuota de bacterias competentes se descongeló en hielo y se añadieron 10 μ l del ADN de interés. Esta mezcla se mantuvo en hielo durante 20 min, y se incubó a 42°C durante 1 min. Seguidamente, la mezcla se incubó 2 min en hielo, y se añadieron 800 μ l de LB previamente atemperado a 37°C. La mezcla se incubó durante 2 h a 37°C en agitación (200 r.p.m.). El cultivo se plaqueó en LB agar con el antibiótico necesario para la selección de colonias transformadas con el plásmido de interés.

9.2. Transformación de *E. coli* mediante electroporación

Este método fue utilizado para generar cepas de *E. coli* SW20 y *E. coli* BL21 electrocompetentes para su posterior transformación con ADN plasmídico y/o lineal. Los plásmidos usados y generados en este trabajo se describen en la **Tabla A2** (Anexo I).

Un pre-inóculo de la cepa de interés crecido en LB, fue diluido hasta $DO_{600} = 0,05$ en 200 ml de LB en un matraz de 1 l. El cultivo se creció a 37°C en agitación (200 r.p.m.) hasta alcanzar $DO_{600} = 0,5$. En este punto, el crecimiento del cultivo fue frenado mediante una incubación en hielo durante 20 min. Las bacterias fueron recogidas mediante centrifugación (4.000 r.p.m., 15 min, 4°C) y el *pellet* se resuspendió cuidadosamente en 0,5 volúmenes (respecto el volumen inicial de 200 ml) de agua Milli-Q pre-enfriada. La suspensión bacteriana se incubó durante 10 min en hielo y centrifugó (4.000 r.p.m., 15 min, 4°C). El *pellet* se lavó con 0,25 volúmenes (respecto el volumen inicial de 200 ml) de agua Milli-Q pre-enfriada. La suspensión bacteriana se incubó durante 10 min en hielo y se centrifugó (4.000 r.p.m., 15 min, 4°C). El *pellet* se resuspendió en 0,05 volúmenes (respecto el volumen inicial de 200 ml) de agua Milli-Q + 15% glicerol pre-enfriada. Las bacterias resuspendidas se centrifugaron (4.000 r.p.m., 15 min, 4°C), el *pellet* resultante se resuspendió en 1 ml de agua Milli-Q + 15% glicerol y se alícuotó para su uso inmediato y/o almacenamiento a -80°C. Las muestras se mantuvieron en hielo durante todo el proceso.

Para la transformación de bacterias electrocompetentes, se añadió al menos 1 μ g de ADN plasmídico diluido en un máximo de 10 μ l a una alícuota de bacterias electrocompetentes de 40 μ l. Se empleó un electroporador modelo *Gene Pulser Xcell II* junto con el *PC Module* (Bio-Rad), cubetas de 2 mm *Gene Pulser Cuvettes* (Bio-Rad) y las siguientes condiciones: tipo de pulso: caída exponencial; capacitancia: 25 μ F; resistencia: 200 W; voltaje de descarga: 2,5 kV; fuerza

del campo eléctrico aplicado: 10-20 kV/cm; duración del pulso: ~5 ms. Tras aplicar el pulso eléctrico, las bacterias se resuspendieron rápidamente en 800 µl de LB y se incubaron durante 2 h a 37°C en agitación (200 r.p.m.). Seguidamente, el cultivo se plaqueó en LB agar con el antibiótico necesario para la selección de colonias transformadas con el plásmido de interés.

9.3. Transformación de *H. influenzae* mediante inducción de la competencia natural (Método M-IV)

Este método se empleó para la transformación de *H. influenzae* con ADN lineal. Para ello, se indujo la competencia natural de las bacterias en medio M-IV, en el cual no se produce crecimiento bacteriano, y que se prepara fresco para cada transformación. La preparación del medio M-IV se detalla en la **Tabla 2**. Este método ha sido descrito en anterioridad (Herriott *et al.* 1970, Barcak *et al.* 1991) y fue utilizado en este trabajo para transformar las cepas RdKW20 y HiNT375.

Tabla 2. Preparación del medio M-IV.

Solución 21	Concentración
Ácido L-Aspártico	4,0 mg/ml
Ácido L-Glutámico	0,2 mg/ml
Ácido Fumárico	1,0 mg/ml
NaCl	4,7 mg/ml
Tween 80	0,02 mg/ml
K ₂ HPO ₄	0,87 mg/ml
KH ₂ PO ₄	0,67 mg/ml
Autoclavar la solución.	
Solución 22	Cantidades para 100 ml
L-Cisteína	0,4 g
L-Tirosina	0,1 g
Disolver en 10 ml de 1N HCl a 37°C.	
Enrasar a 100 ml con agua destilada y seguir añadiendo.	
L-Citrulina	0,06 g
L-Fenilalanina	0,2 g
L-Serina	0,3 g
L-Alanina	2 mg/ml
Filtrar la solución.	
Solución 23	Concentración
CaCl ₂	0,1 M
Autoclavar la solución.	
Solución 24	Concentración
MgSO ₄	0,1 M
Autoclavar la solución.	
Solución 40	Concentración
Casaminoácidos libres de vitamina	5% (p/v)
Filtrar la solución.	

10. GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS Y ESTIRPES BACTERIANAS

Los cebadores utilizados en este apartado, así como los plásmidos empleados y generados, se recogen en las **Tablas A2 y A3**, respectivamente (ver Anexo I).

10.1. Generación de las cepas mutantes de HiNT

Se generó una disrupción del gen *glpQ* en las cepas Hi RdKW20 y HiNT375. Para ello, se utilizó una estrategia que implica la sustitución del gen a mutar por un gen de resistencia a espetinomicina mediante transformación natural y doble recombinación homóloga. Este método se ha descrito con anterioridad (Tracy *et al.* 2008) y se detalla en la **Figura 8**.

Se amplificó mediante PCR un fragmento de ADN que contiene el gen *glpQ* y las regiones flanqueantes aguas arriba y abajo (1.000 pb a cada lado) usando como molde (i) ADN genómico de RdKW20 y los cebadores *glpQ_Rd_F1* y *glpQ_R1*, (ii) ADN genómico de HiNT375 y los cebadores *glpQ_375_F1* y *glpQ_R1*. Los productos de PCR fueron clonados en pJET1.2 (Thermo Fisher Scientific), generando los plásmidos (i) pJET1.2-*glpQ*_{RdKW20} y (ii) pJET1.2-*glpQ*_{HiNT375}. Un *cassette* mutagénico que contiene un gen de resistencia a espectinomicina (*Spec^r*) fue amplificado mediante PCR utilizando como molde el plásmido pRSM2832. Para ello, se utilizaron cebadores que añaden a ambos lados secuencias complementarias para recombinar con el inserto del (i) pJET1.2-*glpQ*_{RdKW20} (*glpQ_Rd_F2* y *glpQ_Rd_R2*) y (ii) pJET1.2-*glpQ*_{HiNT375} (*glpQ_375_F2* y *glpQ_375_R2*). Bacterias *E. coli* SW102 electrocompetentes fueron co-electroporadas con pJET1.2-*glpQ* (50 ng) y el *cassette* mutagénico *Spec^r* (200 ng). Se seleccionaron eventos de recombinación resultantes en clones portadores de los plásmidos (i) pJET1.2-*glpQ*_{RdKW20}::*spec* o (ii) pJET1.2-*glpQ*_{HiNT375}::*spec*, en LB agar Amp₁₀₀ Spec₅₀ (**Apartado 9.2**). Estos plásmidos fueron utilizados como molde para amplificar mediante PCR los *cassettes* de disrupción *glpQ*_{RdKW20}::*spec* y *glpQ*_{HiNT375}::*spec*, con los cebadores F1 y R1 (*glpQ_Rd_F1* y *glpQ_R1*; *glpQ_375_F1* y *glpQ_R1*). Las cepas RdKW20 y HiNT375 se transformaron con los respectivos *cassettes* de disrupción mediante el método M-IV (**Apartado 9.3**). Así, cada *cassette* *glpQ*::*spec* se insertó en el genoma de la cepa correspondiente mediante doble recombinación homóloga, sustituyendo el gen *glpQ*. Los transformantes con eventos de recombinación homóloga correctos se seleccionaron en sBHI agar+Spec₅₀, obteniendo las cepas mutantes RdKW20Δ*glpQ* y HiNT 375Δ*glpQ*. Las disrupciones se comprobaron mediante PCR.

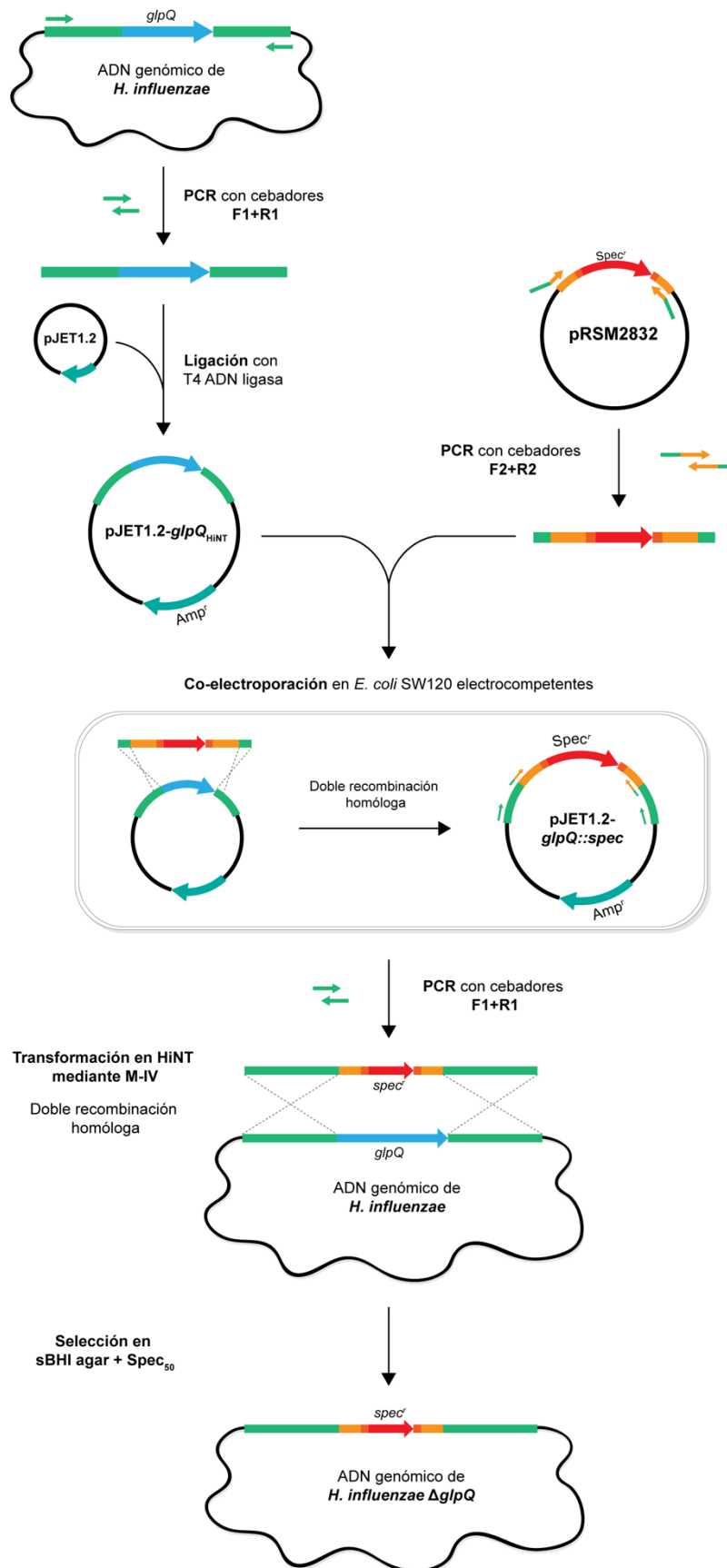


Figura 8. Proceso de interrupción genética del gen *glpQ* (Δ *glpQ*) en *H. influenzae* mediante una estrategia que implica la sustitución del gen a mutar por un gen de resistencia a espetinomicina mediante transformación natural y doble recombinación homóloga.

11. CULTIVO CELULAR Y MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

La línea celular de carcinoma humano A549 (ATCC CCL185), derivada de neumocitos tipo II, se utilizó en experimentos de infección por *H. influenzae* de células epiteliales inmortalizadas. Las células A549 se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con suero bovino fetal inactivado a 60°C durante 1 h (STF descomplementado) (Sigma-Aldrich), tampón HEPES 10 mM (Sigma-Aldrich) y un cóctel de antibióticos y antimicóticos formado por penicilina 100 U/ml, sulfato de estreptomicina 0,1 mg/ml y anfotericina B 0,5 µg/ml (RPMI completo).

Las células se crecieron en botellas de plástico de 25 cm² en una atmósfera saturada de humedad al 95%, a 37°C y con 5% CO₂. El crecimiento de esta línea celular se produce de manera adherente, por lo que antes de alcanzar la total confluencia del cultivo (cuyo las células ocupan ~90% del espacio disponible en la base del frasco) se realizaron pases. Para ello, las células fueron despegadas de la base de la botella utilizando tripsina (Sigma-Aldrich), para su recuento mediante una cámara de Neubauer, dilución y crecimiento en una nueva botella.

12. INFECCIÓN DE CÉLULAS EN CULTIVO

Todos los ensayos de infección de células A549 con *H. influenzae* se realizaron en placas de 24 pocillos, habiendo realizado el depósito de células correspondiente para tener ~4-5·10⁵ células/pocillo en el momento de realizar el experimento, lo que se corresponde con un ~90% de confluencia. Cuando los experimentos se diseñaron para observar eventos de infección mediante microscopía de inmunofluorescencia, se colocó en cada pocillo un cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro previo al depósito de las células sobre este. El medio RPMI completo se reemplazó por RPMI completo sin suero bovino fetal (RPMI -STF) 16 h antes del ensayo de infección, para sincronizar la población celular en la misma etapa del ciclo celular. Previo a la infección, las células se lavaron tres veces con PBS1X y se añadió 1 ml de EBSS/pocillo (*Earle's Balanced Salt Solution*) (Invitrogen). Se preparó una suspensión bacteriana de la cepa de interés en PBS1X ajustada a DO₆₀₀ = 1 a partir de biomasa crecida en chocolate agar (*input*). Se utilizó un volumen variable de este *input* (según el experimento) para infectar las células en EBSS. Durante la infección, las placas de 24 pocillos se incubaron a 37°C, 5% CO₂.

Todos los ensayos de infección epitelial se realizaron mediante métodos previamente optimizados y descritos por el grupo de investigación (Morey *et al.* 2011, López-Gómez *et al.* 2012, Euba *et al.* 2015b).

12.1. Adhesión bacteriana al epitelio respiratorio

Se determinó la adhesión de las cepas de *H. influenzae* al epitelio respiratorio. Para ello las células A549 fueron infectadas, a no ser que se especifique lo contrario, con 100 µl del *input* de la cepa de interés/pocillo para obtener una multiplicidad de infección de ~100 bacterias por célula (MOI 100:1). Tras 30 min, tiempo durante el cual las bacterias se adhieren a la superficie celular, sin invadir las células, cada pocillo fue lavado 3 veces con 1 ml PBS1X/pocillo, para eliminar bacterias no adheridas a las células. Seguidamente, las células epiteliales fueron lisadas mecánicamente tras ser expuestas durante 10 min a 300 µl PBS1X-saponina 0,025%/pocillo. Este lisado se empleó para realizar un banco de diluciones en PBS1X, que se plaqueó en sBHI agar para el recuento de u.f.c., y de esta forma estimar la tasa de adhesión epitelial por *H. influenzae*.

De forma alternativa, cuando el ensayo de adhesión se realizó sobre cubreobjetos de vidrio, tras los 30 min de infección, se realizaron 5 lavados con PBS1X, se añadió a cada pocillo 300 µl de PFA 3% y se incubó a T^a ambiente durante 20 min. A continuación, se hicieron 3 lavados con

PBS1X y las placas se conservaron a 4°C con 1 ml PBS1X/pocillo hasta la posterior tinción de cubreobjetos (**Apartado 13**).

12.2. Invasión bacteriana en el epitelio respiratorio

Se determinó la invasión de las cepas de *H. influenzae* en el epitelio respiratorio. Para ello, las células A549 fueron infectadas, a no ser que se especifique lo contrario, con 200 µl del *input* de la cepa de interés/pocillo, para obtener una multiplicidad de infección de ~100 bacterias por célula (MOI 200:1). Tras 2 h, tiempo durante el cual las bacterias se adhieren e invaden las células, cada pocillo fue lavado 3 veces con 1 ml PBS1X/pocillo, para eliminar bacterias no adheridas a las células. En este momento, se incubó cada pocillo con 1 ml de medio RPMI completo, sin el cóctel de antibióticos, con gentamicina 200 µg/ml, durante 1 h (RPMI –ATB +Gm₂₀₀). La gentamicina es un antibiótico que no permeabiliza la membrana de las células eucariotas y elimina de forma selectiva la población bacteriana extracelular sin afectar las bacterias que ya hubieran invadido las células. Tras este tiempo, cada pocillo fue sometido a 3 lavados consecutivos con 1 ml de PBS1X. Seguidamente, las células epiteliales fueron lisadas mecánicamente tras ser expuestas durante 10 min a 300 µl PBS1x-saponina 0,025%/pocillo. Este lisado se empleó para realizar un banco de diluciones en PBS1X, que se plaqueó en sBHI agar para el recuento de u.f.c. y así estimar la tasa de invasión epitelial por *H. influenzae*.

Alternativamente, cuando el ensayo de invasión se realizó sobre cubreobjetos de vidrio, tras la hora con RPMI –ATB +Gm₂₀₀, se realizaron 5 lavados con PBS1X, se añadieron 300 µl PFA 3%/pocillo, y las placas se incubaron a T^a ambiente durante 20 min. A continuación, se hicieron 3 lavados con PBS1X y las placas se conservaron a 4°C con 1 ml PBS1X/pocillo hasta la posterior tinción de cubreobjetos (**Apartado 13**).

12.3. Vida intracelular bacteriana en el epitelio respiratorio

Este ensayo es una variante del descrito en el apartado 12.2, en el que se utilizaron tiempos de infección más largos para monitorizar la dinámica de la localización intracelular de HiNT en el epitelio respiratorio.

Las infecciones se realizaron del mismo modo que en el ensayo de invasión previamente descrito (Ver **Apartado 12.2**). Tras la primera hora con RPMI –ATB +Gm₂₀₀, el medio se sustituyó por RPMI –Ab con gentamicina 16 µg/ml (RPMI –ATB +Gm₁₆) para que una exposición prolongada a gentamicina no dañe la integridad de las células. Los tiempos de infección variaron como se detalla en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Tiempos de infección en ensayos de vida intracelular.

Tiempo postGm	Descripción
1h	2h infección + 1h Gm ₂₀₀
2h	2h infección + 1h Gm ₂₀₀ + 1h Gm ₁₆
4h	2h infección + 1h Gm ₂₀₀ + 3h Gm ₁₆
6h	2h infección + 1h Gm ₂₀₀ + 5h Gm ₁₆
8h	2h infección + 1h Gm ₂₀₀ + 7h Gm ₁₆
24h	2h infección + 1h Gm ₂₀₀ + 23h Gm ₁₆

Los pocillos con cubreobjetos se procesaron de la misma que en ensayos de adhesión e invasión (**Apartados 12.1.** y **12.2.**), lavando los cubreobjetos 3 veces con 1 ml PBS1X/pocillo, fijándolos durante 20 min con PFA 3%, y conservándolos a 4°C con 1 ml de PBS1X hasta su posterior tinción (**Apartado 13**).

13. TINCIÓN Y MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

El material biológico fijado en los cubreobjetos generados en los experimentos de infección *in vitro* (**Apartado 12**) se tiñó para su análisis mediante inmunofluorescencia directa o indirecta, según el caso, y así observar las bacterias y moléculas/estructuras celulares de interés.

Los anticuerpos primarios (Ab 1º) y secundarios (Ab 2º), así como otros marcadores fluorescentes utilizados, se describen en la **Tabla 4**. En el caso de ensayos de infección para observar la vida intracelular de HiNT en compartimentos subcelulares con pH ácido, se utilizó el marcador fluído *Lysotracker RedDN99* (Invitrogen). Para ello, *Lysotracker RedDN99* 0,5 µM fue añadido a cada pocillo 45 min antes de la fijación de los cubreobjetos.

Tabla 4. Marcadores utilizados para inmunomarcaje específico en el presente trabajo.

Marcador	Tipo	Antígeno/Marcaje	Origen	Dilución	Fuente
αHiNT	Ab 1º	HiNT	Conejo	1:600	(Morey <i>et al.</i> 2011)
βαc-Alexa488	Ab 2º	Ab conejo	Burro	1:100	Jackson Inm.
αLamp1	Ab 1º	Lamp1 (Endosoma tardío)	Ratón	1:75	DSHB
βαr-RRX	Ab 2º	Ab ratón	Burro	1:100	Jackson Inm.
Hoechst 33342	Agente intercalante	ADN	-	1:2500	Molecular Probes
<i>Lysotracker RedDN99</i>	Sonda fluorescente	Compartimentos ácidos	-	-	Invitrogen

***CLAVE:** c: conejo, b: burro, r: ratón.

En todos los casos, las tinciones se realizaron en un volumen final de 40 µl PBS1X con 10% suero de caballo, 0,1% saponina y los marcadores y/o anticuerpos correspondientes. Los cubreobjetos se lavaron 2 veces con PBS1X-saponina 0,1%, una vez con PBS1X y se incubaron con los anticuerpos primarios en una cámara oscura y húmeda durante 40 min. Seguidamente, se repitió el proceso para la incubación con los anticuerpos secundarios. A continuación, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS1x-saponina 0,1%, una vez con PBS1X y otra con agua Milli-Q, y se montaron sobre portaobjetos de vidrio con el gel montador *Aqua Poly/Mount* (Polysciences). Las preparaciones montadas se almacenaron en oscuridad a 4°C y se analizaron con un microscopio de fluorescencia Axioskop 2 plus. Las imágenes se tomaron con la cámara AxioCam MRm y se procesaron con el software informático Adobe Photoshop CC 2017 (Adobe Systems Incorporated).

14. HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE *IN SITU*

La hibridación fluorescente *in situ* (*Fluorescent In Situ Hybridization*, FISH) se utilizó para visualizar bacterias metabólicamente activas durante la infección de células epiteliales en cultivo. Este procedimiento se basa en la hibridación del ARN de los ribosomas bacterianos

(ARNr) con oligonucleótidos complementarios conjugados con fluorocromos y su posterior procesamiento mediante microscopia de fluorescencia.

Tras la fijación con PFA 3%, los cubreobjetos fueron lavados 3 veces con agua MilliQ e hibridados con oligonucleótidos siguiendo un método previamente descrito (Neef *et al.* 1996). Las sondas de ADN EUB338 (5'GCTGCCTCCCGTAGGAGT3') y GAM42a (5'GCCTTCCCACATCGTTT3'), conjugadas con Cy3 o Alexa 488, fueron diseñadas para marcar específicamente ARNr de Eubacterias y ARNr de Gamma-proteobacterias, respectivamente (Manz *et al.* 1992). Ambas sondas se usaron simultáneamente para amplificar la señal fluorescente, a una concentración de 5 nM cada una en tampón de hibridación (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,01% SDS; 0,9 M NaCl; 35% formamida). La hibridación se llevó a cabo en una cámara húmeda a 46°C durante 90 min. Seguidamente, los cubreobjetos se sumergieron en tampón de lavado (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 5 mM EDTA, pH 8; 0,01% SDS; 80 mM NaCl) durante 30 min a 48°C. Tras el lavado, se realizó la tinción fluorescente del ADN y Lamp-1, y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos de vidrio, del modo ya descrito (**Apartado 13**).

15. INFECCIÓN INTRANASAL EN MODELO ANIMAL MURINO

Para analizar el nivel de virulencia de cepas de HiNT de interés, se utilizó un modelo de infección murino establecido previamente por el grupo de investigación (Morey *et al.* 2013, Euba *et al.* 2015b, Euba *et al.* 2015a, Rodríguez-Arce *et al.* 2017).

Se utilizaron ratones CD1 hembra de 4-6 semanas y 20-22 g (n=5/grupo). Los animales fueron alojados en jaulas adecuadas (Nº registro animalarios UPNA, ES/31-2016-000002-CR-SU-US) con agua y alimento *ad libitum* antes de comenzar los experimentos, siguiendo las recomendaciones del Comité de Ética y Experimentación Animal y Bioseguridad (CEEAB) y según la legislación vigente RD 1261/2005.

La cepa HiNT se realsó en una placa de agar chocolate y se creció durante 12 h, a 37°C con 5% CO₂. Las bacterias se recogieron con 1 ml de PBS1X. Esta suspensión bacteriana se ajustó con PBS1X a DO₆₀₀=1 (~10⁹ u.f.c./ml). ~4,16 ml de la suspensión bacteriana ajustada fueron centrifugados (3.500 r.p.m., 5 min, Tª ambiente). El *pellet* se resuspendió en 1 ml PBS1X, obteniendo una suspensión bacteriana con una concentración ~ 5·10⁹ u.f.c./ml. Con esta suspensión, además de infectar los animales, se preparó un banco de diluciones en PBS1X que se plaqueó en sBHI agar para estimar el *input* de la infección (u.f.c./ratón).

Los animales se anestesiaron intraperitonealmente con 20 µl de una mezcla formada por 375 µl Ketamina (Imagene), 250 µl Rompun (Bayer) y 375 µl PBS1X. Cada animal fue infectado intranasalmente con 20 µl de la suspensión bacteriana preparada (10⁸ u.f.c./animal) con la ayuda de una punta de micropipeta, dejando caer la gota sobre la nariz del animal y que éste la inhale. Tras esto, los animales fueron alojados sobre una manta eléctrica durante el periodo necesario para su recuperación de la anestesia.

A 24 y 48 h post-infección (hpi), los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, para cuantificar la carga bacteriana en pulmón y en lavado broncoalveolar (LBA). Con la ayuda de un catéter estéril intravenoso Vialon (Beckton-Dickinson) de 1,1 mm de diámetro, se introdujeron 700 µl PBS1X por la tráquea de cada animal. El volumen de PBS1X introducido se recuperó, conformando el LBA, que se utilizó para realizar un banco de diluciones en PBS1X plaqueándose por triplicado en sBHI agar. Seguidamente, uno de los pulmones de cada animal se diseccionó, se colocó de forma individual en una bolsa de *stomacher* estéril (Seward) y se añadió PBS1X (1:9 p/v). El pulmón se homogeneizó y se realizaron diluciones seriadas que se plaquearon en sBHI agar de forma análoga que al LBA.

16. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO SÓDICO (SDS-PAGE)

Se utilizó electroforesis SDS-PAGE para analizar el patrón proteico de cepas bacterianas de interés. Para ello, se utilizaron extractos celulares completos a partir de bacterias crecidas en placa o en cultivo líquido. También se realizaron geles SDS-PAGE para monitorizar el proceso de sobreexpresión y purificación de la proteína GlpQ_{HIINT375}.

En todos los casos, a no ser que se especifique lo contrario, se emplearon geles con 10% poliacrilamida (fase de resolución). Para la preparación de los extractos proteicos, se utilizaron 100 µl de la suspensión bacteriana de interés a los que se añadió el mismo volumen de tampón de carga 2X (*Loading Buffer*, LB) (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% p/v, glicerol 10%, DTT 50 mM, azul de bromofenol 0.01% p/v). La muestra se sonicó durante 10 min utilizando un baño de ultrasonidos. Seguidamente, la muestra se calentó a 95°C durante 5 min, y se cargó en el gel previamente preparado. La separación electroforética se realizó con un equipo Mini PROTEAN Tetra System (Bio-Rad).

Para observar el patrón de bandas, se realizó una tinción con azul de Coomassie (Bio-Rad), incubando el gel en suave agitación con el producto durante 10 h. A continuación, se lavó el exceso de azul de Coomassie destiñendo el gel durante 3-4 h, en agitación con solución de destinción (metanol 10%, ácido acético 10%). Para conservar el gel desteñido, se mantuvo hidratado en agua MilliQ. Alternativamente, los geles de poliacrilamida con SDS se utilizaron en ensayos de inmunodetección (*western blotting*) (**Apartado 16**).

17. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

Las muestras a analizar se prepararon y procesaron como se ha descrito anteriormente (**Apartado 15**). Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa mediante el sistema de transferencia húmeda *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad). Se aplicó un voltaje de 10 V durante 35 min, y se comprobó la eficiencia del proceso de transferencia con solución Ponceau S (Sigma-Aldrich). Seguidamente, la membrana se bloqueó con una solución de leche en polvo 4% en TBS1X-Tween 20 0,1% (*Tris-buffered saline*: 50 mM Tris-Cl, pH 7,5; 150 mM NaCl) durante 1 h. A continuación, se realizaron 3 lavados consecutivos de la membrana durante 5 min en TBS1X-Tween 20 0,1%. La proteína Hmw1A se detectó incubando la membrana con el anticuerpo primario cobaya anti-HmwA (gp85) (Buscher *et al.* 2006) diluido 1:2.000 en TBS1X-Tween 20 0,1% leche 4% (p/v) durante 4 h, a 4°C y en agitación. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 5 min/lavado en TSB1X y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario cabra anti-cobaya IgG conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz), diluido 1:5.000 en TBS1X 4% leche (p/v) durante 1 h a T^a ambiente. Las membranas se revelaron con el kit *ECL Advance Western Blotting Detection Kit* (GE HealthCare).

18. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE GlpQ_{HIINT375}

Se utilizó la cepa recombinante *E. coli* BL21 pT7.7/*glpQ*_{NTHI375} (**Apartado 10.2.**) y una adaptación de un método previamente descrito (Su *et al.* 2015).

Las muestras se mantuvieron a 4°C en todos los pasos del proceso, a no ser que se indique lo contrario. Cuando fue necesario, las muestras se almacenaron a -20°C. Durante todo el proceso, se recogieron fracciones para procesarlas mediante electroforesis SDS-PAGE (**Apartado 15**) y monitorizar la eficiencia de la purificación.

18.1. Expresión de la proteína GlpQ_{HINT375}

Un pre-inóculo de la cepa *E. coli* BL21-pT7.7/*glpQ*_{NTHi375} crecido en LB fue diluido a DO₆₀₀ = 0,05 en 500 ml de LB, en un matraz de 2 l, por duplicado, obteniendo un volumen total de cultivo de 1 l. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación (200 r.p.m.) hasta alcanzar DO₆₀₀ = 0,9. A continuación, se añadió a cada matraz IPTG 1 mM para inducir la expresión de GlpQ_{HINT375} y se continuó con la incubación durante 3 h. Ambos cultivos se centrifugaron (2.900 r.p.m., 30 min, 4°C) y el *pellet* resultante se resuspendió en 30 ml de tampón 50 mM Tris-HCl, pH 8. Una tableta de inhibidor de proteasas *cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche) se añadió a la suspensión bacteriana.

18.2. Lisis y fraccionamiento celular

Las bacterias resuspendidas se lisaron en una presa French, pasando 3 veces el extracto a una presión de 1.100 psi. La muestra lisada se centrifugó (16.000 r.p.m., 30 min, 4°C) y se recogió el sobrenadante para su procesamiento.

18.3. Precipitación de ácidos nucleicos

Se añadieron 200 mg de sulfato de estreptomicina (Sigma-Aldrich) al lisado para precipitar los ácidos nucleicos. La muestra se incubó durante 20 min a 4°C con agitación suave. Seguidamente, se centrifugó (16.000 r.p.m., 20 min, 4°C) y se separó el sobrenadante para seguir con el proceso.

18.4. Precipitación fraccionada de GlpQ_{HINT375} con sulfato amónico (SA)

A partir de una disolución saturada de SA (100%) en tampón fosfato 20 mM, pH 7, se añadió el volumen necesario para llevar la muestra a 33% de SA. La adición de esta sal se hizo de forma cuidadosa, gota a gota, y utilizando agitación lenta. La muestra se incubó 2 h a 4°C sin agitación y se centrifugó (2.000 r.p.m., 15 min, 4°C). El sobrenadante se separó, se añadió SA hasta el 40% y se incubó 2 h a 4°C sin agitación. La muestra se centrifugó (2.000 r.p.m., 15 min, 4°C) y se volvieron a separar *pellet* y sobrenadante. El nuevo sobrenadante se llevó al 45% SA, se incubó 2 h a 4°C sin agitación, y se centrifugó (2.000 r.p.m., 15 min, 4°C). Las muestras tomadas durante la precipitación se monitorizaron mediante electroforesis SDS-PAGE, comprobando que el sobrenadante del 45% SA contenía prácticamente la totalidad de la proteína recombinante. Esta fracción fue la seleccionada para seguir con la purificación.

18.5. Diálisis

Para eliminar de la muestra toda la sal que fue añadida en el paso de precipitación fraccionada, el sobrenadante al 45% SA se dializó frente a tampón 50 mM Tris-HCl, pH 8 utilizando membranas *Spectra/Por MWCO 6-8000 Da* (Spectrum Labs). Se realizaron 5 cambios, cada uno de 2 h, a 4°C y en agitación suave.

18.6. Cromatografía de intercambio iónico

Se montó una columna de intercambio aniónico de dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa) de 15 x 2 cm (Santa Cruz Biotechnology). La columna fue equilibrada con tampón A (50 mM Tris-HCl, pH 8) filtrado y de-gasificado, a un flujo de 0,5 ml/min. Por otro lado, los tampones B (50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 0,5 M) y C (50 mM Tris-HCl, pH 8, NaCl 1 M) se filtraron y de-gasificaron.

Los ~35 ml de muestra se sembraron en la columna a un flujo de 0,5 ml/min y se lavó la columna con 40 ml de tampón A hasta recuperar la línea de base. Todo el volumen eluido de la columna se recogió en dos fracciones que se almacenaron a -20°C. A continuación, se realizó un gradiente discontinuo de 0 a 0,3 M NaCl con un flujo del tampón C a 0,5 ml/min, durante 1 h. Seguidamente, se mantuvo el lavado con el tampón B hasta estabilizar la línea base. Durante todo el gradiente, se recogieron fracciones de 1,5 ml y se almacenaron para su posterior análisis y uso. Finalmente, se realizó un lavado con tampón C para eluir cualquier proteína que siguiera unida a la columna, recogiendo 4 fracciones de 20 ml.

Todo el proceso se realizó con un equipo de cromatografía líquida de proteína rápida (*Fast Protein Liquid Chromatography*, FPLC) *ÄKTA purifier* (GE HealthCare). Tras cada una de las etapas de la cromatografía, se tomaron muestras de las fracciones de interés y se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE para comprobar la presencia y el grado de pureza de GlpQ_{HINT375} en dichas fracciones.

18.7. Determinación de la concentración de la proteína GlpQ_{HINT375}

Las fracciones que contuvieron GlpQ en ausencia de otros contaminantes proteicos, se juntaron y concentraron empleando un concentrador tipo Centricon *Centriprep Centrifugal Filter Unit 10K 4304* (Merk). Se realizaron 5 ciclos de concentración (centrifugando 30 min a 3.500 r.p.m. y a 4°C) y dilución para eliminar paulatinamente restos de ADN de pequeño tamaño todavía presentes. A continuación, se recogieron espectros de la muestra en la región del UV-visible (350-240 nm) en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2100, se comprobó la ausencia de restos de DNA, siendo la relación de absorbancia a 280/260 nm superior a 1.8, y se determinó la concentración de GlpQ en la muestra utilizando el coeficiente de extinción molar teórico, $\epsilon = 61310 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Para finalizar, la muestra se separó en alícuotas de 400 μl que se almacenaron a -20°C.

19. CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE GlpQ_{HINT375}

19.1. Espectrometría de masas (MS)

El análisis por MS de la proteína GlpQ purificada se realizó en el Servicio de Masas del Instituto de Química Física Rocasolano (CSIC). Se realizó con un sistema Finnigan LC-MS (ThermoFisher). La adquisición y tratamiento de los datos se realizó con el software informático Xcalibur 1.2 (Thermo Fisher Scientific) y los espectros obtenidos se procesaron con la herramienta de deconvolución Biomass incluida en el programa BioWorks 3.0 (Thermo Fisher Scientific).

19.2. Ultracentrifugación analítica (UA)

Los experimentos de velocidad de sedimentación se realizaron a 20°C en una ultracentrífuga Optima XL-A (Beckman Coulter). Las medidas se efectuaron en tampón 10 mM Tris a pH 8.0 en distintas condiciones de fuerza iónica, en presencia de 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Sigma-Aldrich), 1 mM CaCl₂ ó 1 mM MgCl₂ a 45.000 r.p.m. utilizando células de doble sector. La distribución de coeficientes de sedimentación se calculó con el programa SEDFIT (Schuck & Rossmanith 2000) y se utilizó un volumen específico de 0,73954 ml/g, calculado con SEDNTERP (Laue *et al.* 1992) a partir de la secuencia de aminoácidos. Con este programa, se calcularon la densidad y viscosidad de cada condición experimental, y estos valores se utilizaron para la estimación del coeficiente de sedimentación en agua a 20°C [$S_{w(20,w)}$].

19.3. Dicroísmo circular (DC)

Los experimentos de DC se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-810 equipado con un sistema Peltier de control de temperatura. Los espectros se registraron a 50 nm/min con un tiempo de respuesta de 4 s. Se recogieron datos cada 0,2 nm y cada curva experimental es la media de 4 acumulaciones. Se utilizaron cubetas de cuarzo con pasos ópticos de 0,1 cm (UV-lejano) y 1 cm (UV-cercano). Tras corregir la contribución del tampón por sustracción, se normalizaron las curvas para obtener la elipticidad molar utilizando la masa molecular promedio por residuo. La adquisición y el tratamiento de los datos experimentales se realizaron con el paquete informático Spectra Manager (JASCO).

20. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES BACTERIANOS

La cuantificación del ARN mensajero (ARNm) bacteriano se utilizó para medir los niveles de expresión de un panel de genes de interés en diferentes cepas de *H. influenzae*.

20.1. Extracción de ARN bacteriano

Se prepararon pre-inóculos (**Apartado 1**) de las cepas de interés, que se emplearon para inocular 50 ml de sBHI en un matraz de 250 ml, diluyendo el pre-inóculo a $DO_{600} = 0,07$. Los cultivos se crecieron en agitación (200 r.p.m.) a 37°C con 5% CO_2 hasta alcanzar $DO_{600} = 0,4-0,5$. Siete ml de cada cultivo fueron centrifugados a 3.500 r.p.m. durante 3 min, a 4°C. Inmediatamente, el *pellet* resultante se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó un máximo de 24 h a -80°C previo a su procesamiento. Se realizó una extracción del ARN total bacteriano utilizando el método Trizol (Toledo-Arana *et al.* 2009).

20.2. Análisis de la calidad del ARN

Una vez se extrajo el contenido total de ARN de las cepas de interés, se midió su concentración y la relación de absorbancias 260nm/230nm de las muestras con un equipo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Con estos valores, se ajustó la concentración de ARN de las muestras a 200 ng/ μ l con agua comercial (Sigma-Aldrich) y se evaluó su calidad usando *RNA 600 Nano LabChips* y un equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer*. En todos los casos, se obtuvo material no degradado, ARN de alta calidad, con los ARN ribosomales (ARNr) 16S y 23S intactos.

20.3. Retrotranscripción

Se utilizó 1 ng del ARN total extraído para sintetizar 1000 ng de ADN complementario (ADNc). Para la retrotranscripción, se empleó el kit *PrimeScript RT Reagent Kit* (TaKaRa) siguiendo las instrucciones del fabricante.

20.4. PCR cuantitativa a tiempo real

Para la PCR cuantitativa a tiempo real (*quantitative* PCR, qPCR) se utilizaron los reactivos *Luminaris HiGreen qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) y un equipo *AriaMx Realtime PCR System* (Agilent). Los cebadores utilizados se diseñaron con el software Primer3 (bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0), y se recogen en la **Tabla A2** (Anexo I).

Las condiciones de reacción fueron:

Desnaturalización inicial: 3 min; 95°C

45 ciclos de: - Desnaturalización: 10 s; 95°C

- Anillamiento: 30 s; 55°C

Curvas de disociación: incremento de 65°C a 95°C, 0,5°C cada 5 s

Con los resultados obtenidos, se determinaron las cantidades relativas de ARNm determinando el ciclo umbral (Ct) en cada caso. El Ct de cada gen se normalizó utilizando el valor Ct del gen ARNr 16S (ARNr 16S), como control endógeno. En cada caso, el valor de expresión normalizado se calculó como $2^{-\Delta Ct} \cdot 100$, siendo ΔCt la diferencia entre el Ct del ARNm de un gen concreto y el Ct del gen ARNr 16S ($Ct_{unknown} - Ct_{16S}$).

Para cada cepa de *H. influenzae* se realizaron como mínimo dos extracciones de ARN independientes, realizándose las qPCR por triplicado ($n \geq 6$).

21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los casos se utilizó el *software* informático GraphPad Prism 6 para elaborar el análisis estadístico y las representaciones gráficas. Los resultados están expresados como la media \pm la desviación estándar. Las barras de error de las gráficas corresponden al error típico. La igualdad de los resultados se contrastó a partir de un análisis de la varianza (ANOVA) de una cola o el test *t* de Student de dos colas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuyo el valor de P (*P-value*) fue inferior a 0,05.

/RE

RESULTADOS

1. ADAPTACIÓN METABÓLICA DE *H. influenzae* A CONDICIONES CAMBIANTES DE CONCENTRACIÓN DE OXÍGENO

1.1. Análisis del metabolismo de HiNT en condiciones variables de disponibilidad de O₂

H. influenzae es un miembro de la microbiota nasofaríngea de individuos con función pulmonar normal, y un patógeno oportunista causante de exacerbaciones EPOC. Las evidencias disponibles sugieren que HiNT está adaptado al aparato respiratorio de los pacientes EPOC, donde existen condiciones de disponibilidad de oxígeno y nutrientes que difieren de las presentes en su nicho habitual, es decir, las vías respiratorias altas de individuos con función pulmonar normal. HiNT es una bacteria anaerobia facultativa, y presenta un amplio arsenal genético que favorece su adaptación metabólica en el pulmón del paciente EPOC. Evidencias publicadas y observaciones previas del grupo de investigación apuntan a que, según la concentración de oxígeno, HiNT realiza distintos tipos de metabolismo, dando a lugar a distintos metabolitos durante su crecimiento (**Tabla 5**).

Tabla 5. Compuestos clave detectados en el medio de crecimiento de *H. influenzae* RdKW20 (arriba) y HiNT411 (abajo). Se midió la concentración de los metabolitos resultantes del metabolismo de la bacteria crecida en tres condiciones de disponibilidad de O₂ distintas; aerobiosis, microaerofilia y anaerobiosis, tras 24 h de crecimiento en medio químicamente definido (*Chemically Defined Medium*, CDM) suplementado con glucosa, piruvato e iosina (sCDM). Los datos referentes al metabolismo de RdKW20 se extraen de un estudio liderado por la Dra. Ulrike Kappler, de la Universidad de Queensland, Australia (Othman *et al.* 2014). Los datos referentes al metabolismo de HiNT411 fueron generados por el grupo de la Dra. Ulrike Kappler, del modo previamente descrito, en colaboración con este grupo de investigación.

Metabolitos	Concentración inicial	Aerobiosis	Microaerofilia	Anaerobiosis	Referencia
RdKW20					
Sustratos	Glucosa	10	8,326	4,228	4,082
	Piruvato	0,87	0,031	0,040	0,025
	Inosina	6,5	0,866	2,444	2,689
Productos	Acetato	n.d.	11,61	6,43	4,28
	Formato	n.d.	1,86	4,05	23,36
	Succinato	n.d.	0,011	0,034	0,641
	Glicerol	n.d.	0,856	0,583	0,185
	Hipoxantina	n.d.	3,53	1,75	0,701
	Lactato	n.d.	0,003	0,036	0,013
HiNT411					
Sustratos	Glucosa	6.415	0.000	0.000	2.079
	Piruvato	0.574	0.004	0.000	0.000
	Inosina	4.035	0.001	0.010	1.129
Productos	Acetato	n.d.	11.275	15.065	4.324
	Formato	n.d.	3.397	0.236*	1.587
	Succinato	0.012	3.899	0.018*	5.352
	Fumarato	0.000	0.036	0.000	0.017
	Hipoxantina	0.000	6.969	5.803	4.454

*CLAVE: n.d.: no determinado

RdKW20 es una cepa de *H. influenzae* no patógena descapsulada generada en laboratorio a partir de una cepa de *H. influenzae* serotipo d. Es una cepa de referencia, tradicionalmente utilizada en estudios de caracterización de este patógeno. HiNT411, HiNT584 y HiNT1104 pertenecen a una serie de 3 aislados recogidos de un paciente con broncoectasia durante un periodo de 2 años (Garmendia *et al.* 2014). HiNT411 fue utilizada en paralelo a RdKW20 durante la primera parte del estudio.

Los datos publicados y generados en colaboración con la Dra. Ulrike Kappler indican que, en condiciones de aerobiosis, el acetato es el principal producto final, sugiriendo que la ruta principal de catabolismo de piruvato es la generación de acetil-CoA y la conversión de acetil-P en acetato, catalizada por la acetato quinasa AckA. En anaerobiosis, y en el caso de RdK KW20, el formato es un producto final importante, sugiriendo un cambio en el metabolismo del piruvato con un aumento de flujo metabólico canalizado por la piruvato formato liasa PflA. En las mismas condiciones de anaerobiosis, en el caso de HiNT411, el equilibrio metabólico se desplaza hacia el ciclo de Krebs incompleto, siendo el succinato el producto detectado en mayor concentración, generado por la acción de la fumarato reductasa FrdA (**Tabla 5**). La implicación de estas enzimas en las rutas del metabolismo central de *H. influenzae* se detalla en la **Figura 4** (Introducción).

1.2. Patrón de expresión de genes implicados en el metabolismo central de *H. influenzae* en distintas condiciones de disponibilidad de O₂

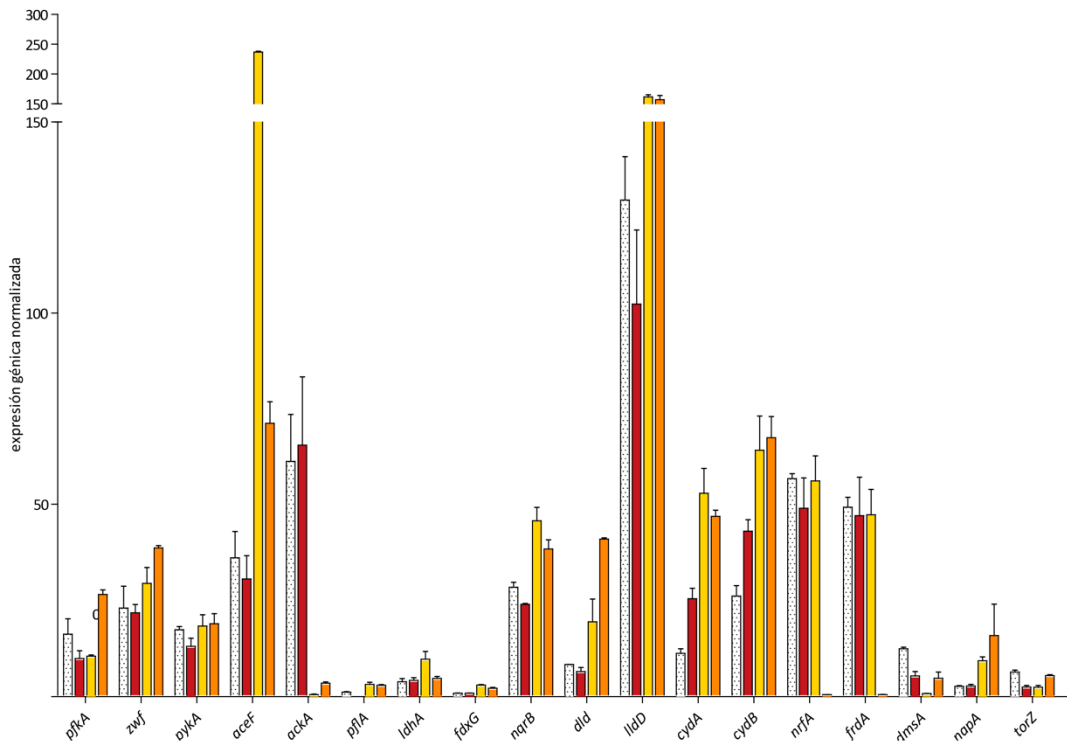
La expresión de un panel de 18 genes que codifican enzimas del metabolismo central de carbohidratos en HiNT se analizó en las cepas RdKW20 y HiNT411, en condiciones de crecimiento con concentraciones de O₂ variables. Para dicho análisis, se utilizaron también mutantes isogénicos en ambos fondos genéticos, carentes de los genes *pflA*, *ackA*, y *frdA*, respectivamente, previamente construidos por el grupo de investigación (**Tabla 6**). Así, se estudió la adaptación metabólica que sigue cada cepa silvestre y mutante en cada una de las condiciones de disponibilidad de O₂ testadas. Para ello, se realizaron cultivos de las cepas en sBHI y se procesaron de acuerdo a lo expuesto en el **Apartado 20** (Materiales y Métodos). Los cultivos de RdKW20 Δ *ackA* y HiNT411 Δ *ackA* se recogieron al alcanzar DO₆₀₀ = 0,2, debido a su crecimiento limitado en comparación al resto de cepas. Los niveles de expresión de cada gen fueron normalizados con los del ARNr 16S de cada cepa y cultivo, para así comparar los niveles de expresión génica entre cepas y condiciones (**Anexo II**).

Tabla 6. Tabla-resumen de los genes cuya expresión fue analizada (arriba) en las cepas elegidas de *H. influenzae* (centro), y en dos condiciones distintas de disponibilidad de O₂ (abajo).

Genes analizados		
Nombre del gen	Enzima que codifica	Proceso en el que interviene
<i>pfkA</i>	6-fosfofructoquinasa	Catabolismo de la glucosa (Glucólisis / Ruta de las Pentosas Fosfato)
<i>zwf</i>	Glucosa-6-fosfato 1-DH	
<i>pykA</i>	Piruvato quinasa	
<i>aceF</i>	Complejo piruvato DH	Catabolismo del piruvato
<i>ackA</i>	Acetato quinasa	
<i>pflA</i>	Piruvato formato liasa	
<i>ldhA</i>	D-lactato DH NAD ⁺ -dependiente	
<i>fdxG</i>	Formato DH	
<i>nqrB</i>	NADH DH	Cadena de transporte de electrones
<i>dld</i>	D-lactato DH	
<i>lldD</i>	L-lactato DH	
<i>cydA</i>	Citocromo bd oxidasa	
<i>cydB</i>	Citocromo bd oxidasa	
<i>nrfA</i>	Nitrito reductasa	
<i>frdA</i>	Fumarato reductasa	
<i>dmsA</i>	DMSO reductasa	
<i>napA</i>	Nitrato reductasa	
<i>torZ</i>	TMAO reductasa	
Cepas analizadas		
RdKW20		HiNT411
RdKW20 Δ <i>pflA</i>		HiNT411 Δ <i>pflA</i>
RdKW20 Δ <i>ackA</i>		HiNT411 Δ <i>ackA</i>
RdKW20 Δ <i>frdA</i>		HiNT411 Δ <i>frdA</i>
Condiciones de disponibilidad de O ₂		
Aerobiosis (crecimiento con O ₂)		Anaerobiosis (crecimiento sin O ₂)

A

Aerobiosis



B

Anaerobiosis

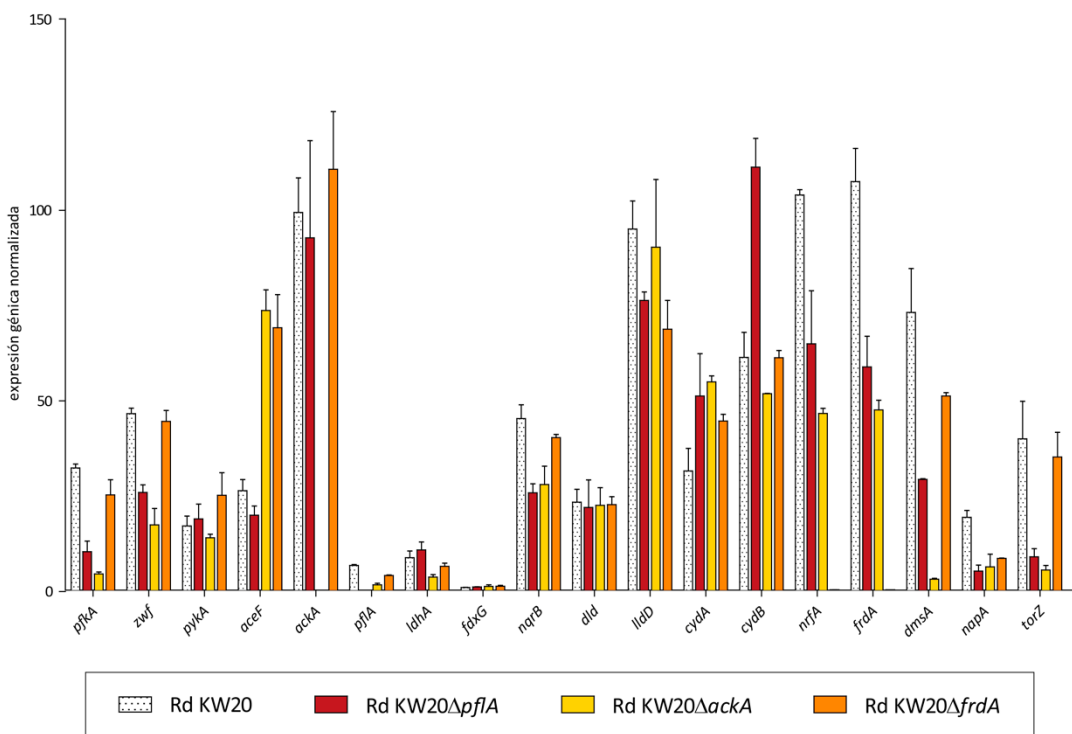
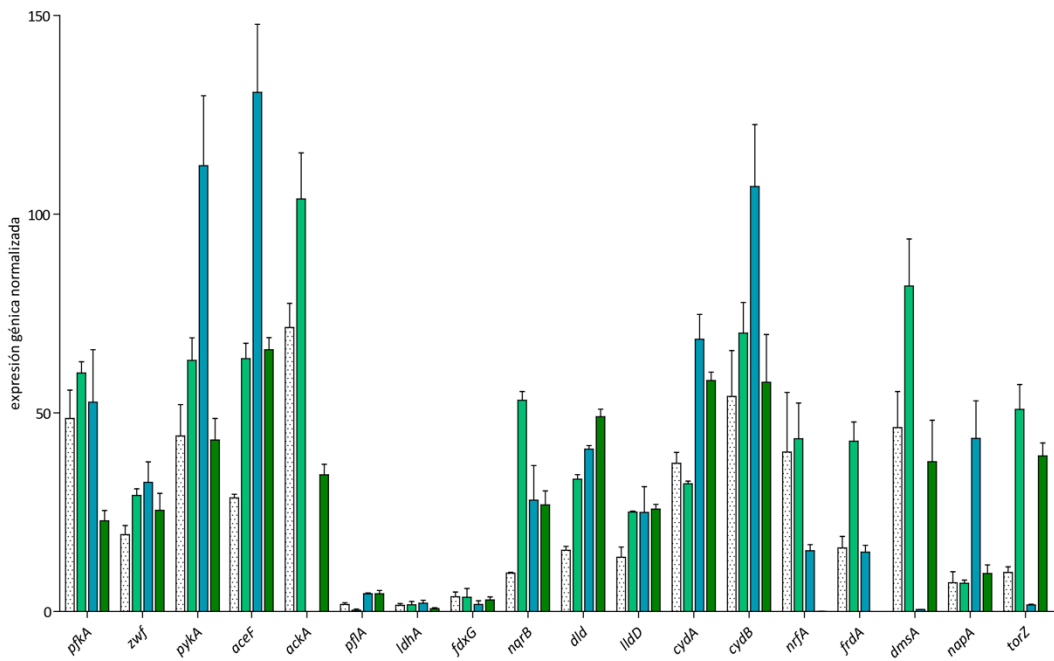


Figura 9. Niveles normalizados de expresión de 19 genes clave en el metabolismo de carbohidratos en las cepas RdKW20 (barras blancas), RdKW20 Δ pfIA (barras rojas), RdKW20 Δ ackA (barras amarillas), RdKW20 Δ frdA (barras naranjas) en condiciones de (A) aerobiosis, y (B) anaerobiosis.

A

Aerobiosis

**B**

Anaerobiosis

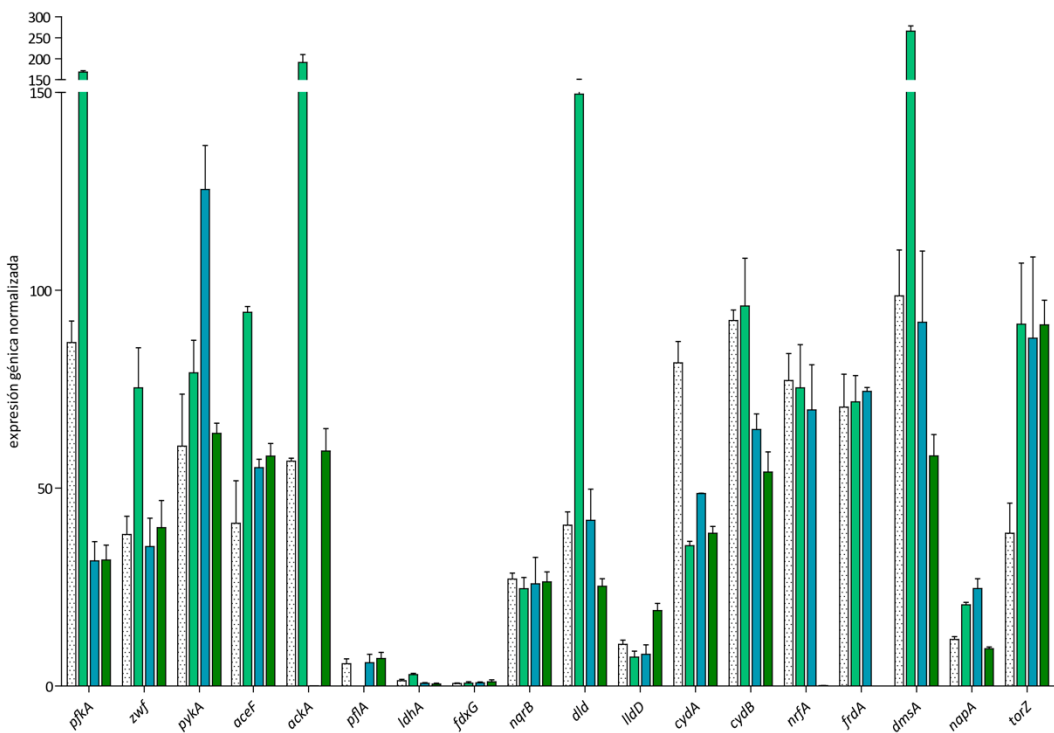


Figura 10. Niveles normalizados de expresión de 19 genes clave en el metabolismo de carbohidratos en las cepas HiNT411 (barras blancas), HiNT411Δ*pfIA* (barras verde claras), HiNT411Δ*ackA* (barras azules), HiNT411Δ*frdA* (barras verde oscuras) en condiciones de (A) aerobiosis, y (B) anaerobiosis.

Los niveles de expresión génica en RdKW20 fueron mayores en anaerobiosis que en aerobiosis en un número significativo de los genes analizados (**Figura 9**). El grupo de genes involucrados en la glucólisis (*pfkA*, *zwf* y *pykA*) así como la mayoría de los relativos al anabolismo del piruvato (*aceF*, *pflA*, *ldhA*, *fdxG*) no presentan cambios significativos en sus niveles de expresión entre ambas condiciones de disponibilidad de oxígeno. El gen *ackA* presenta una alta expresión en anaerobiosis, a pesar de que RdKW20 produce menor cantidad de acetato que en aerobiosis (**Tabla 5**). La expresión de los genes *cydB*, *nrfA*, *frdA*, *dmsA*, *napA* y *torZ* aumenta en anaerobiosis, mientras que la de *lldD* disminuye (**Tabla 7**).

Tabla 7. Niveles de expresión de cada gen en la cepa RdKW20 en condiciones de aerobiosis (izquierda) y anaerobiosis (derecha). Los niveles de expresión génica se han separado en muy bajo [0-10), bajo [10-50), medio [50-100) y alto [100-300]. Se resaltan en **negrita** aquellos genes cuya expresión es distinta entre condiciones.

Gen	Nivel de expresión en aerobiosis	Nivel de expresión en anaerobiosis
<i>pfkA</i>	Bajo	Bajo
<i>zwf</i>	Bajo	Bajo
<i>pykA</i>	Bajo	Bajo
<i>aceF</i>	Bajo	Bajo
<i>ackA</i>	Medio	Alto
<i>pflA</i>	Muy bajo	Muy bajo
<i>ldhA</i>	Muy bajo	Muy bajo
<i>fdxG</i>	Muy bajo	Muy bajo
<i>nqrB</i>	Bajo	Bajo
<i>dld</i>	Bajo	Bajo
<i>lldD</i>	Alto	Medio
<i>cydA</i>	Bajo	Bajo
<i>cydB</i>	Bajo	Medio
<i>nrfA</i>	Medio	Alto
<i>frdA</i>	Medio	Alto
<i>dmsA</i>	Bajo	Medio
<i>napA</i>	Muy bajo	Bajo
<i>torZ</i>	Muy bajo	Bajo

En el caso de HiNT411, sus niveles de expresión génica fueron también mayores en anaerobiosis que en aerobiosis, en términos generales (**Figura 10**). De los genes involucrados en la glucólisis, *pykA* es el único que aumenta su expresión al disminuir la concentración de O₂. Los genes *nqrB*, *lldD*, *cydA*, *nrfA*, y *dmsA* presentan expresión aumentada en anaerobiosis respecto a la de aerobiosis, todos ellos relacionados con la cadena de transporte electrónico. El gen *frdA*, encargado de catalizar la transformación de fumarato a succinato, producto acumulado tras su metabolismo en condiciones de anaerobiosis, ve su expresión aumentada en estas condiciones (**Tabla 8**).

De este modo, los niveles de expresión de un número significativo de genes son mayores en anaerobiosis que en aerobiosis, tanto en RdKW20 como en HiNT411. Además, varios genes implicados en la cadena de transporte electrónico aumentan su expresión al disminuir la concentración de O₂ en los dos fondos genéticos analizados.

El mutante $\Delta ackA$ es el que más cambios en su patrón de expresión experimenta respecto la cepa silvestre, en ambos fondos genéticos, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis. Los mutantes $\Delta pflA$ y $\Delta frdA$ mantienen un número de variaciones en su patrón de expresión similar, si bien RdKW20 $\Delta frdA$ experimenta más cambios respecto RdKW20 que RdKW20 $\Delta pflA$ en aerobiosis (**Figuras 9 y 10**). Para analizar el impacto de la pérdida de los genes *pflA*, *ackA* y *frdA* en las cepas RdKW20 y HiNT411, en cada una de las condiciones de disponibilidad de O₂, a

continuación, se compara el patrón de expresión génica de cada cepa mutante con el de su respectiva cepa silvestre, crecidas en las mismas condiciones.

Tabla 8. Niveles de expresión de cada gen en la cepa HiNT411 en condiciones de aerobiosis (izquierda) y anaerobiosis (derecha). Los niveles de expresión génica se han separado en muy bajo [0-10), bajo [10-50), medio [50-100) y alto [100-300]. Se resaltan en **negrita** aquellos genes cuya expresión es considerablemente distinta entre condiciones.

Gen	Nivel de expresión en aerobiosis	Nivel de expresión en anaerobiosis
<i>pfkA</i>	Medio	Medio
<i>zwf</i>	Bajo	Bajo
<i>pykA</i>	Bajo	Medio
<i>aceF</i>	Bajo	Bajo
<i>ackA</i>	Medio	Medio
<i>pfIA</i>	Muy bajo	Muy bajo
<i>ldhA</i>	Muy bajo	Muy bajo
<i>fdxG</i>	Muy bajo	Muy bajo
<i>nqrB</i>	Muy bajo	Bajo
<i>dld</i>	Bajo	Bajo
<i>lldD</i>	Muy bajo	Bajo
<i>cydA</i>	Bajo	Medio
<i>cydB</i>	Medio	Medio
<i>nrfA</i>	Bajo	Medio
<i>frdA</i>	Bajo	Medio
<i>dmsA</i>	Bajo	Medio
<i>napA</i>	Muy bajo	Muy bajo
<i>torZ</i>	Muy bajo	Bajo

RdKW20 Δ *pfIA* en aerobiosis, disminuye la expresión de *lldD*, por lo que su crecimiento en estas condiciones puede producir niveles de L-lactato superiores a los de la cepa silvestre. En cuanto a los genes involucrados en la cadena de transporte electrónico, algunos aumentan su expresión (*cydAB*) y otros la disminuyen (*dmsA*). En anaerobiosis, RdKW20 Δ *pfIA* disminuye la expresión de *zwf* y de la mayoría de los enzimas relacionados con la cadena de transporte electrónico (*nrfA*, *dmsA*, *napA*, *torZ*) mientras que la de otros aumenta (*cydAB*). La expresión del gen *frdA* también está reducida en este mutante en anaerobiosis (**Figura 11**).

HiNT411 Δ *pfIA* en aerobiosis destaca por el aumento de la expresión de los genes *frdA*, *aceF* y *ackA*. Los genes de la glucólisis no varían sus niveles de expresión, mientras que genes implicados en la cadena de transporte electrónico aumentan su expresión (*dld*, *nqrB*, *dmsA*, *torZ*). En anaerobiosis, genes de la glucólisis presentan una expresión aumentada (*pfkA*, *zwf*). La expresión de *aceF* y *ackA* aumenta del mismo modo que en aerobiosis, sugiriendo una acumulación de acetato en ambas condiciones. La expresión de genes de la cadena de transporte electrónico aumenta (*dld*, *dmsA*, *napA*, *torZ*) o disminuye (*cydA*) indistintamente (**Figura 12**).

De este modo, la mutación Δ *pfIA* tiene distinto efecto en los dos fondos genéticos analizados. El efecto es mayor en la cepa HiNT411, que parece compensar la pérdida del gen *pfIA* con la producción de acetato y succinato, en aerobiosis, y de acetato en anaerobiosis.

En condiciones de alta disponibilidad de O₂, RdKW20 Δ *ackA* presenta niveles de expresión de *pfIA* mayores que los de RdKW20. Esta cepa no puede producir acetato, principal producto del metabolismo aerobio de RdKW20, lo que quizá intenta compensar de manera ineficiente aumentando los niveles de ARNm de *aceF*, gen que codifica la enzima previa a *ackA*. Los genes involucrados en la cadena de transporte de electrones, en términos generales, aumentan su expresión en aerobiosis respecto RdKW20 (*dld*, *lldD*, *cydAB*, *dmsA*). En anaerobiosis, los genes

pfkA y *zwf*, relacionados con la glucólisis, disminuyen su expresión. En estas condiciones, RdKW20 Δ *ackA* también sobreexpresa *aceF*. Los niveles de expresión de *frdA*, *pflA* y *ldhA* disminuyen, por lo que, en estas condiciones, RdKW20 Δ *ackA* no producirá succinato, formato o D-lactato, respectivamente. No obstante, el principal producto de su metabolismo puede ser el L-lactato, ya que el gen *lldD*, encargado de la conversión del L-lactato a piruvato, presenta una expresión disminuida. En anaerobiosis, RdKW20 Δ *ackA* presenta una disminución de la expresión de varios genes implicados en la cadena de transporte electrónico (*nrfA*, *dmsA*, *napA*, *torZ*) (Figura 11).

En condiciones de alta disponibilidad de O₂, HiNT411 Δ *ackA* aumenta la expresión de *pykA*, encargado de convertir el fosfoenolpiruvato en piruvato. Los genes *aceF* y *pflA* aumentan también su expresión, del modo ya observado en RdKW20 Δ *ackA* para las mismas condiciones. Los genes relativos a la cadena de transporte electrónico aumentan (*dld*, *nqrB*, *cydAB*, *napA*) o disminuyen (*nrfA*, *torZ*) su expresión. Esta cepa, en anaerobiosis, aumenta la expresión de *pykA*, mientras que disminuye la de *pfkA*, ambos involucrados en la glucólisis. Los genes pertenecientes al metabolismo del piruvato no muestran variaciones en su patrón de expresión, en contraposición a los genes de la cadena de transporte de electrones que principalmente disminuyen su expresión (*cydA*, *cydB*) (Figura 12).

En conjunto, la pérdida de *ackA* afecta distintamente a los patrones de expresión génica del metabolismo central de *H. influenzae* en los fondos genéticos y condiciones analizados. No obstante, es común que, a pesar de la pérdida del gen *ackA*, la expresión del gen que codifica la enzima previa a *AckA*, *aceF*, aumente, lo que llevaría a la acumulación de acetil-fosfato por RdKW20 Δ *ackA* en aerobiosis y anaerobiosis, y por HiNT411 Δ *ackA* en aerobiosis. Además, RdKW20 Δ *ackA* y HiNT411 Δ *ackA* aumentan la expresión de *pflA*, desviando su metabolismo en aerobiosis al propio de condiciones anaerobias.

RdKW20 Δ *frdA*, en aerobiosis, aumenta la expresión de *aceF* y *pflA*, por lo que el metabolismo de esta cepa podría desviarse hacia la acumulación formato y acetato en presencia de O₂. La mayoría de genes involucrados en la cadena de transporte electrónico (*dld*, *lldD*, *cydAB*) aumentan su expresión en RdKW20 Δ *frdA* cuando dispone de O₂. En anaerobiosis, RdKW20 Δ *frdA* disminuye la expresión de *pfkA*, gen relativo a la glucólisis. También disminuyen su expresión genes de la cadena de transporte electrónico como *lldD*, *nrfA*, *dmsA* y *napA*. En anaerobiosis, esta cepa aumenta la expresión de *aceF* sin modificar significativamente la de *ackA*, y disminuye la de *pflA* (Figura 11).

HiNT411 Δ *frdA* disminuye la expresión del gen *pfkA* en aerobiosis y anaerobiosis. En aerobiosis, HiNT411 Δ *frdA* aumenta la expresión de *pflA*, *aceF* y *ackA*. El patrón de expresión de genes relacionados con la cadena de transporte electrónico varía, en líneas generales hacia su aumento (*dld*, *nqrB*, *cydAB* y *napA*). En anaerobiosis, HiNT411 Δ *frdA* no realiza cambios significativos en la expresión de los genes relacionados con el catabolismo del piruvato. Sin embargo, disminuye la expresión de la mayoría de genes relativos al transporte electrónico (*dld*, *cydAB*, *nrfA*, *dmsA*) (Figura 12).

Así, la pérdida del gen *frdA* produce un aumento de la expresión de *aceF* y/o *ackA* así como de *pflA* en RdKW20 y HiNT411 en aerobiosis. De este modo, ambas cepas compensarían la mutación Δ *frdA* aumentando la producción de acetato y formato en estas condiciones de crecimiento.

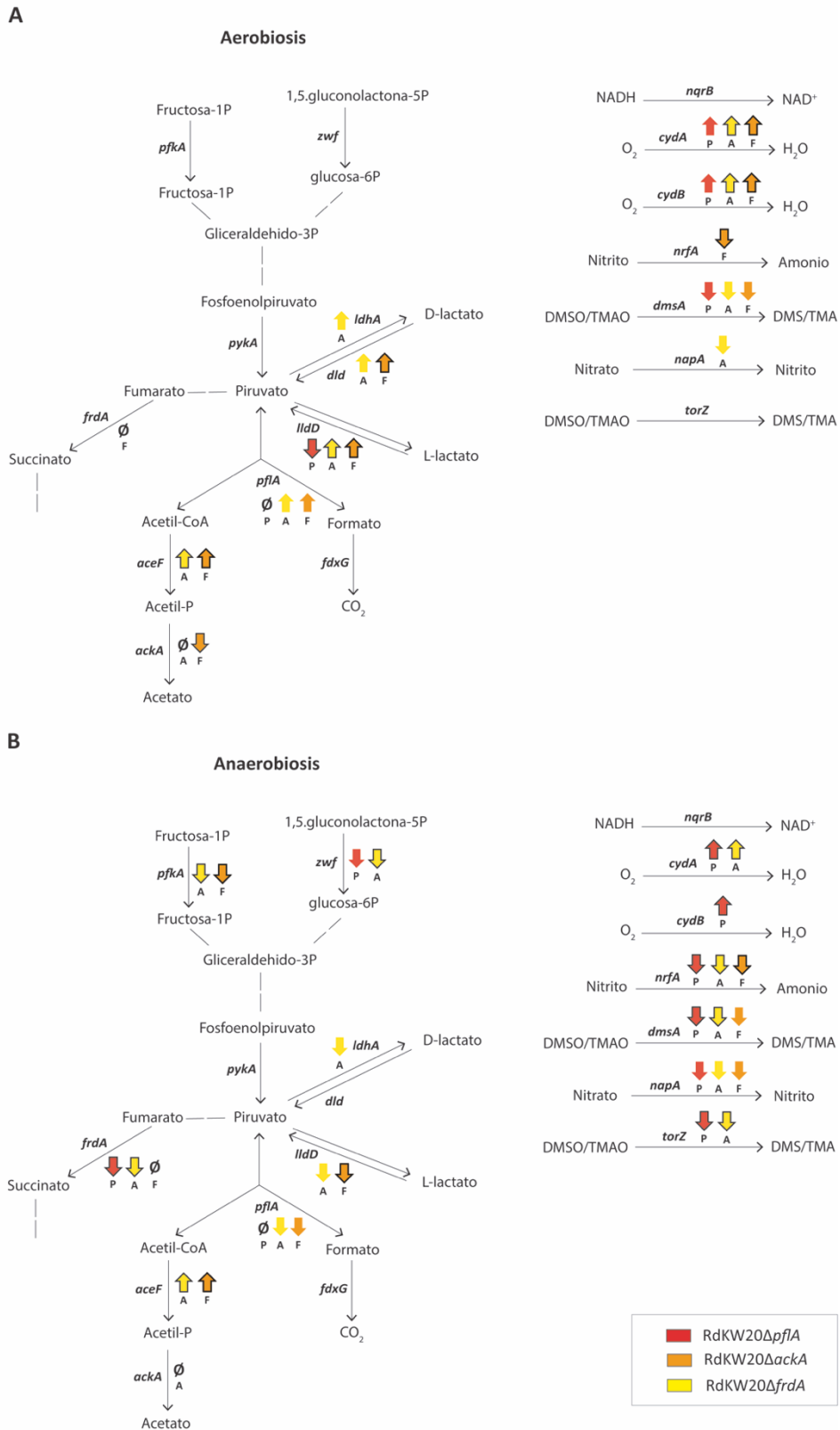


Figura 11. Cambios en el patrón de expresión de genes metabólicos en las cepas RdKW20Δ*pfIA*, RdKW20Δ*ackA* y RdKW20Δ*frdA* respecto a RdKW20 silvestre. Se representa un esquema simplificado del metabolismo central de *H. influenzae*, donde se indican los genes cuya expresión ha sido analizada. El aumento (flecha ascendente) o descenso (flecha descendente) en la expresión de cada gen en RdKW20Δ*pfIA*, RdKW20Δ*ackA* y RdKW20Δ*frdA* respecto RdKW20, se representa para cada gen. Cuando el cambio en la expresión fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$), la flecha aparece con contorno negro, cuando la flecha representa una tendencia, aparece sin contorno. El símbolo \emptyset se utiliza para señalar la expresión nula de los genes para los cuales son mutantes.

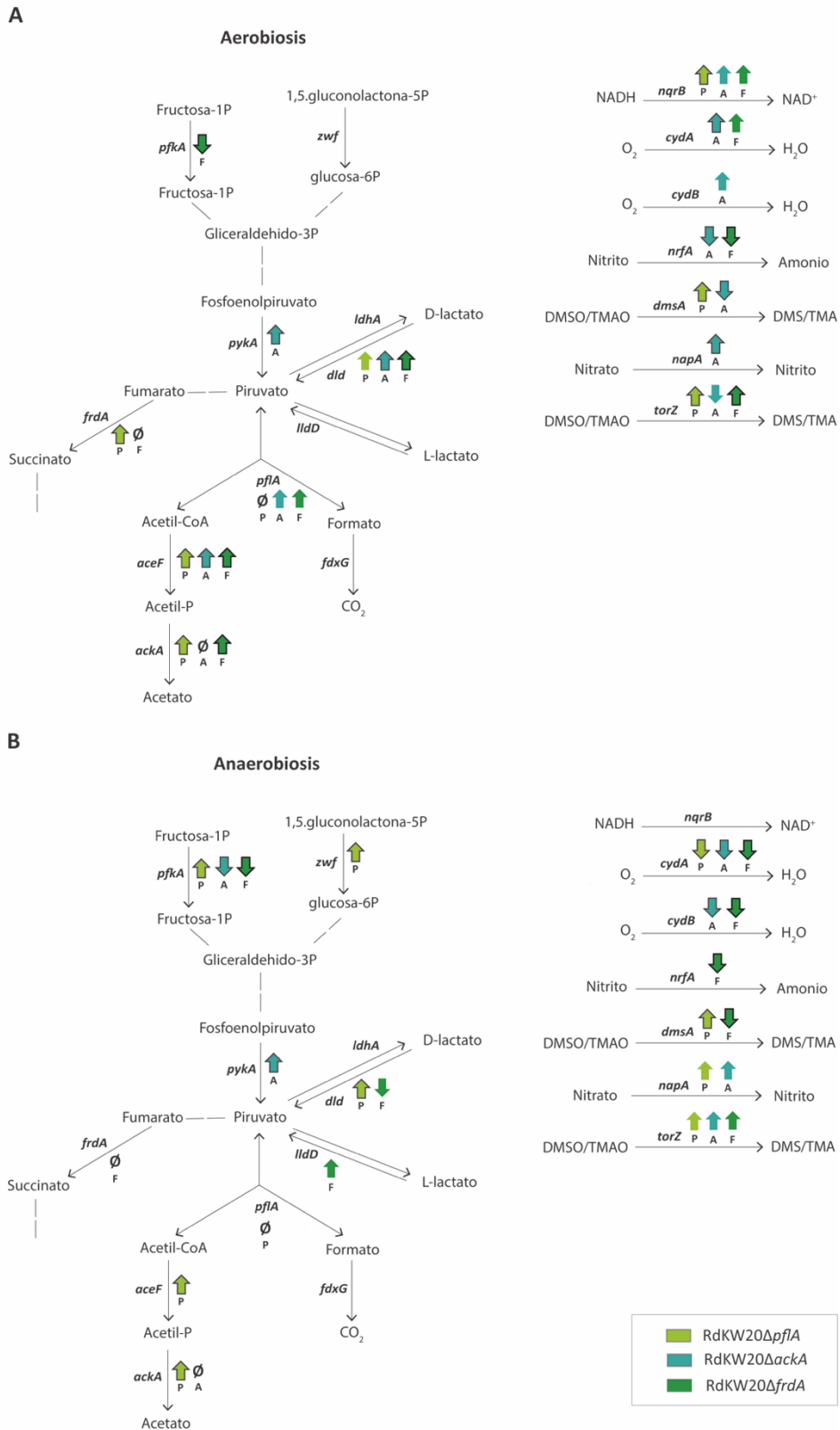


Figura 12. Cambios en el patrón de expresión de genes metabólicos en las cepas HiNT411Δ*pf1A*, HiNT411Δ*ackA* y HiNT411Δ*frdA* respecto a HiNT411 silvestre. Se representa un esquema simplificado del metabolismo central de *H. influenzae*, donde se indican los genes cuya expresión ha sido analizada. El aumento (flecha ascendente) o descenso (flecha descendente) en la expresión de cada gen en HiNT411Δ*pf1A*, RdKW20Δ*ackA* y RdKW20Δ*frdA* respecto RdKW20, se representa para cada gen. Cuando el cambio en la expresión fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$), la flecha aparece con contorno negro, cuando la flecha representa una tendencia, aparece sin él. El símbolo \emptyset se utiliza para señalar la expresión nula de los genes para los cuales son mutantes.

2. CARACTERIZACIÓN DEL FENOTIPO HIPERINVASOR DE HiNT EN EL EPITELIO RESPIRATORIO HUMANO

2.1. Descripción de la colección de cepas de HiNT aisladas de pacientes EPOC empleada en este trabajo

Se utilizó una colección de cepas clínicas aisladas de muestras de esputo recogidas de 13 pacientes EPOC severos ingresados por exacerbación de la enfermedad en el *Hospital Universitari de Bellvitge* (HUB), Barcelona. Se trata de una colección longitudinal prospectiva de 91 aislados, recogida durante 9 años (2005-2014) (**Figura 13**). No fue necesario tomar el consentimiento informado a los pacientes ya que el procedimiento realizado es parte de la rutina del servicio de microbiología del hospital. La identidad de estos pacientes ha sido preservada durante todo el trabajo.

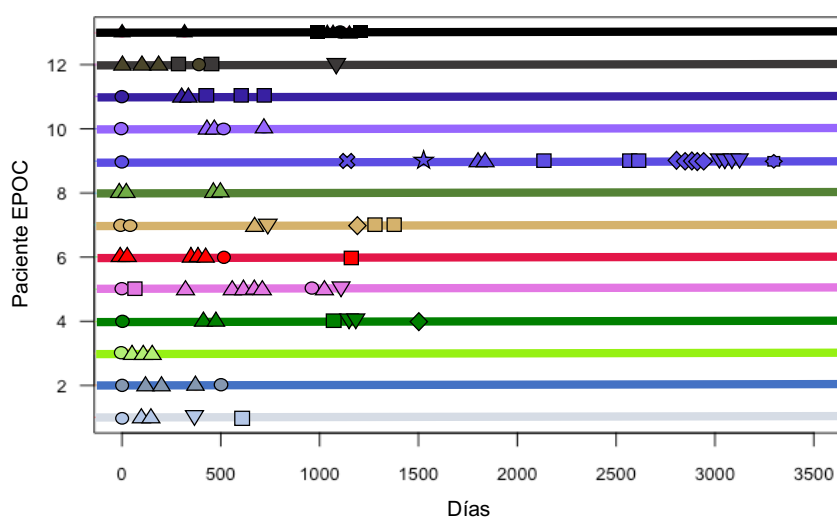


Figura 13. Estructura de la colección de aislados clínicos EPOC. La colección está integrada por 13 pacientes, representados en la figura por 13 líneas y distintos colores. La componen 92 aislados que se representan mediante símbolos geométricos; cepas representadas con mismo símbolo pertenecen al mismo grupo clonal. La distancia entre los símbolos indica la ventana temporal entre el aislamiento de las cepas.

Los aislados clínicos de esta colección han sido previamente caracterizados por el grupo de investigación. Inicialmente, se estableció la relación genómica entre cepas tras su análisis mediante electroforesis de campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE), distribuyendo las 91 cepas en 44 genotipos. A continuación, la secuencia del genoma de todas las cepas se obtuvo mediante secuenciación por síntesis Illumina. Esta tecnología permite tener la secuencia nucleotídica de todo el genoma de HiNT en un número discreto de *contigs*. Para mejorar la calidad de las secuencias y disponer de un genoma completo de referencia por tipo clonal, se eligió un aislado de cada grupo clonal para ser secuenciado con el sistema de secuenciación a tiempo real de una única molécula de ADN de Pacific Biosciences (PacBio), obteniendo todo el genoma de estas cepas en un solo *contig*. Tras el análisis genómico comparado de todos los aislados, se establecieron 33 grupos clonales.

La información relativa a las cepas que conforman esta colección de aislados clínicos EPOC se presenta en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Información relativa a las cepas clínicas de HiNT que componen la colección de aislados clínicos EPOC.

Paciente	Cepa	Fecha aislamiento	PFGE	Tipo secuenciación	Tipo clonal	Presencia gen <i>hap</i>	Variante de Hap	Presencia gen <i>hmwA</i>	DO ₆₀₀ t=5h	Autoagregación
1	P588	13-02-12	B	llumina	1	Sí	1	?	0,378	No
1	P589	22-05-12	C	llumina	2	Sí	2	No	0,3755	No
1	P590	10-07-12	C	llumina	2	Sí	2	No	0,1095	Sí
1	P591	12-02-13	D	llumina	3	Sí	3	Sí	0,0695	Sí
1	P592	18-10-13	AQ	llumina	4	Sí	4	?	0,3345	Medio
2	P593	02-01-12	E	llumina	5	Sí	5	?	0,0665	Sí
2	P594	02-05-12	F	llumina	6	Sí	6	No	0,323	Medio
2	P595	19-07-12	F	PacBio	6	Sí	6	No	0,076	Sí
2	P596	11-01-13	F	llumina	6	Sí	6	No	0,329	Medio
2	P597	17-05-13	G	llumina	7	Sí	7	?	0,3895	No
4	P598	22-12-12	AO	llumina	8	Sí	8	Sí	0,081	Sí
4	P599	28-01-13	AP	llumina	9	Sí	10	No	0,11	Sí
4	P600	06-02-13	AP	llumina	10	Sí	11	No	0,1085	Sí
4	P601	10-04-13	AP	llumina	10	Sí	11	No	0,112	Sí
4	P602	16-05-13	AP	PacBio	10	Sí	11	No	0,048	Sí
5	P603	22-02-10	L	llumina	11	Sí	12	?	0,102	Sí
5	P604	11-04-11	M	PacBio	1	Sí	1	No	0,409	No
5	P605	08-06-11	M	llumina	1	Sí	1	No	0,3697	No
5	P606	07-02-13	N	llumina	12	Sí	13	?	0,031	Sí
5	P607	03-05-13	O	llumina	13	Sí	14	No	0,0475	Sí
5	P608	24-05-13	O	llumina	13	Sí	14	No	0,365	Medio
5	P609	08-04-14	AV	llumina	9	Sí	10	?	0,0245	Sí
6	P610	21-03-11	P	llumina	14	Sí	15	Sí	0,037	Sí
6	P611	20-05-11	Q	llumina	15	Sí	16	?	0,0155	Sí
6	P612	07-02-12	R	llumina	10	Sí	11	No	0,062	Sí
6	P613	28-09-12	R	llumina	10	Sí	11	No	0,118	Sí
6	P614	26-11-12	R	llumina	10	Sí	11	No	0,3255	Medio
6	P615	25-01-13	R	PacBio	10	Sí	11	No	0,084	Sí
6	P616	11-02-13	R	llumina	10	Sí	11	No	0,095	Sí
6	P617	13-11-13	P	PacBio	16	Sí	17	Sí	0,1367	Sí
6	P618	13-01-14	R	llumina	10	Sí	11	No	0,06	Sí
7	P620	08-09-10	T	llumina	10	Sí	11	No	0,0615	Sí
7	P621	23-09-10	T	PacBio	10	Sí	11	No	0,079	Sí
7	P622	25-08-11	T	llumina	10	Sí	11	No	0,0825	Sí
7	P623	13-10-11	T	llumina	10	Sí	11	No	0,0575	Sí
7	P624	25-10-11	T	llumina	10	Sí	11	No	0,0665	Sí
7	P625	06-02-12	U	llumina	18	Sí	21	Sí	0,061	Sí
7	P626	15-11-13	AW	llumina	19	Sí	22	?	0,0575	Sí

Paciente	Cepa	Fecha aislamiento	PFGE	Tipo secuenciación	Tipo clonal	Presencia gen hap	Variante de Hap	Presencia gen hmwA	DO ₆₀₀ t=5h	Autoagregación
8	P627	19-01-09	W	Ilumina	20	Sí	23	Sí	0,039	Sí
8	P628	20-02-09	W	Ilumina	20	Sí	23	Sí	0,0355	Sí
8	P629	24-11-10	X	Ilumina	10	Sí	11	?	0,0535	Sí
8	P630	21-01-11	Y	Ilumina	21	Sí	24	?	0,031	Sí
8	P631	01-05-12	Z	Ilumina	8	Sí	8	Sí	0,0435	Sí
8	P632	27-07-12	AA	Ilumina	10	Sí	11	No	0,0355	Sí
8	P633	26-10-12	AA	Ilumina	10	Sí	11	No	0,058	Sí
9	P634	22-02-11	AF	Ilumina	16	Sí	17	Sí	0,046	Sí
9	P635	08-03-11	AF	Ilumina	16	Sí	17	Sí	0,0305	Sí
9	P636	05-06-12	AF	PacBio	16	Sí	17	Sí	0,1045	Sí
9	P637	30-06-12	AF	Ilumina	16	Sí	17	Sí	0,0905	Sí
10	P638	19-01-05	BA	Ilumina	17	Sí	20	?	0,051	Sí
10	P639	03-03-08	BB	Ilumina	22	Sí	25	?	0,244	Medio
10	P640	31-03-09	BC	Ilumina	23	Sí	26	Sí	0,2277	Medio
10	P641	28-12-09	BD	Ilumina	1	Sí	1	Sí	0,0565	Sí
10	P642	19-01-10	BD	PacBio	1	Sí	1	Sí	0,0875	Sí
10	P643	28-11-10	AC	Ilumina	24	Sí	27	No	0,2777	Medio
10	P644	13-02-12	AC	Ilumina	24	Sí	27	No	0,241	Medio
10	P645	27-03-12	AC	PacBio	24	Sí	27	No	0,2455	Medio
10	P646	25-10-12	AD	Ilumina	25	Sí	28	No	0,1155	Sí
10	P647	13-11-12	AD	Ilumina	25	Sí	28	No	0,408	No
10	P648	29-11-12	AD	Ilumina	25	Sí	29	No	0,4255	No
10	P649	24-12-12	AD	Ilumina	25	Sí	28	No	0,398	No
10	P650	18-01-13	AD	PacBio	6	Sí	6	No	0,1105	Sí
10	P651	06-05-13	AE	Ilumina	9	Sí	10	Sí	0,0445	Sí
10	P652	18-05-13	AE	PacBio	9	Sí	10	Sí	0,021	Sí
10	P653	20-06-13	AE	Ilumina	9	Sí	10	Sí	0,119	Sí
10	P654	05-07-13	AE	Ilumina	9	Sí	10	Sí	0,089	Sí
11	P656	20-01-12	AL	Ilumina	26	Sí	21	?	0,2425	Medio
11	P657	26-03-13	AM	PacBio	27	Sí	30	No	0,068	Sí
11	P658	22-05-13	AM	Ilumina	27	Sí	30	No	0,0825	Sí
11	P660	08-01-14	AM	Ilumina	27	Sí	30	No	0,082	Sí
12	P661	10-02-10	AZ	Ilumina	28	Sí	31	?	0,0283	Sí
12	P662	30-12-10	AG	PacBio	8	Sí	9	Sí	0,044	Sí
12	P663	17-01-11	AG	Ilumina	8	Sí	9	?	0,1135	Sí
12	P664	04-04-11	AH	Ilumina	29	Sí	32	No	0,257	Medio
12	P665	15-10-11	AH	PacBio	29	Sí	32	No	0,071	Sí
12	P666	01-02-12	AH	Ilumina	29	Sí	32	No	0,081	Sí

Paciente	Cepa	Fecha aislamiento	PFGE	Tipo secuenciación	Tipo clonal	Presencia gen <i>hap</i>	Variante de Hap	Presencia gen <i>hmwA</i>	DO ₆₀₀ t=5h	Autoagregación
13	P667	13-02-10	AY	Illumina	16	Sí	18	Sí	0,0305	Sí
13	P668	24-05-10	AY	Illumina	16	Sí	18	Sí	0,0435	Sí
13	P669	16-08-10	AY	PacBio	16	Sí	18	Sí	0,0295	Sí
13	P670	28-11-10	AI	Illumina	30	Sí	33	No	0,1543	Medio
13	P671	10-03-11	AJ	Illumina	31	Sí	34	Sí	0,032	Sí
13	P672	07-05-11	AI	PacBio	30	Sí	33	No	0,0625	Sí
13	P673	05-02-13	AK	Illumina	18	Sí	21	Sí	0,04	Sí
14	P674	01-02-00	A	Illumina	32	Sí	35	?	0,0333	Sí
14	P675	13-12-00	A	Illumina	32	Sí	35	?	0,034	Sí
14	P676	16-10-02	H	Illumina	16	Sí	19	?	0,0335	Sí
14	P677	29-12-02	A	Illumina	32	Sí	35	?	0,029	Sí
14	P678	23-03-03	A	Illumina	32	Sí	35	?	0,026	Sí
14	P679	09-05-03	A	PacBio	33	Sí	36	?	0,022	Sí
14	P851	23-03-03	B	Illumina	16	Sí	19	?	0,0965	Sí
14	P853	09-05-03	H	Illumina	16	Sí	19	Sí	0,051	Sí

2.2. Fenotipo autoagregativo de los aislados clínicos

El ensayo de autoagregación bacteriana se realizó con todas las cepas de la colección. El 76,9% de las cepas presenta una eficiente autoagregación ($DO_{600}[t=5h] = 0,35-0,5$); el 8,8% de las cepas no autoagregan ($DO_{600}[t=5h] = 0-0,15$); y el 14,3% restante presentan un fenotipo intermedio ($DO_{600}[t=5h] = 0,15-0,35$). La distribución de aislados de la colección respecto a su capacidad autoagregativa se muestra en las **Tabla 9** y **Figura 14**.

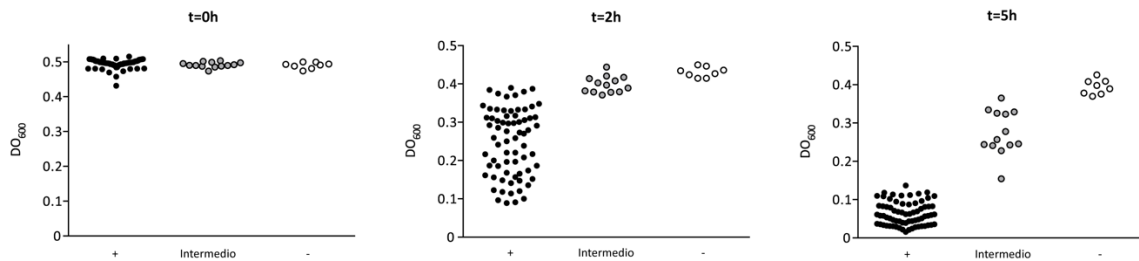


Figura 14. Los 91 aislados clínicos de HiNT presentes en la colección en estudio muestran variabilidad respecto a su capacidad autoagregativa. Suspensiones bacterianas realizadas en PBS1X y normalizadas a $DO_{600} = 0,5$ fueron preparadas a partir de la biomasa de cada aislado crecido en agar chocolate. La DO_{600} se monitorizó en la parte superior de la columna, que permaneció estática durante 5 h. Se muestra la distribución de las cepas a tres tiempos; t=0h, t=2h y t=5h, de izquierda a derecha. Las cepas que autoagregan (+) se representan con círculos negros; las que no autoagregan (-) con blancos; aquellas que presentan un fenotipo intermedio están representadas con círculos grises.

En *H. influenzae*, el fenotipo de autoagregación está asociado a genes que codifican tres proteínas de superficie, el autotransportador Hap (Fink *et al.* 2003) y las adhesinas Hmw1A y Hmw2A (Mell *et al.* 2016). En este trabajo, se utilizará la terminología HmWA para hacer referencia a Hmw1A y Hmw2A de forma conjunta, a no ser que sea necesario referirse a uno de los dos alelos en concreto.

2.2.1. Diversidad alélica de Hap en la colección de aislados HiNT

La secuencia del gen *hap* de las 91 cepas en estudio fue extraída de sus genomas y traducida para analizar la diversidad alélica de este autotransportador. Se identificaron 36 variantes alélicas de Hap (**Tabla 9**). Se realizó un alineamiento múltiple de los 36 alelos utilizando la herramienta online Clustal Omega (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo), que se muestra en el **Anexo III**.

Ochenta y nueve cepas presentan alelos de *hap* completos, que codifican proteínas cuyo tamaño varía entre 1.351 (alelo 3) y 1.480 (alelo 35) aminoácidos. Como excepción, las cepas P589 y P590 presentan un alelo de *hap* truncado, debido a una mutación puntual que introduce un codón de parada que produce la pérdida de los ~300-400 aminoácidos del extremo C-terminal. Estos aminoácidos corresponden al barril β , parte de la proteína anclada a la membrana externa, por lo que estas cepas son mutantes naturales no funcionales para Hap.

Todos los alelos de Hap presentan la secuencia correspondiente al péptido señal conservada. Este fragmento corresponde a los primeros 25 aminoácidos del extremo N-terminal, y tiene la secuencia NH_2 -MKKTVFRLNFLTACI/VSLGIV/ASQAWA-COOH. El péptido señal se identificó mediante la herramienta online predictiva SignalP, a partir de la secuencia de la proteína (cbs.dtu.dk/services/SignalP/). Además, todos alelos presentan la triada catalítica NH_2 -GDSGS-COOH conservada.

Existen diversos puntos calientes de variabilidad en la secuencia de la proteína Hap. Este aspecto se traduce en que existen regiones que acumulan múltiples polimorfismos (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) o pequeñas inserciones/deleciones (*Small insertions and*

deletions, INDELS). Esta variabilidad se encuentra mayoritariamente en el dominio pasajero, que es el dominio catalítico de la proteína (**Figura 15**).

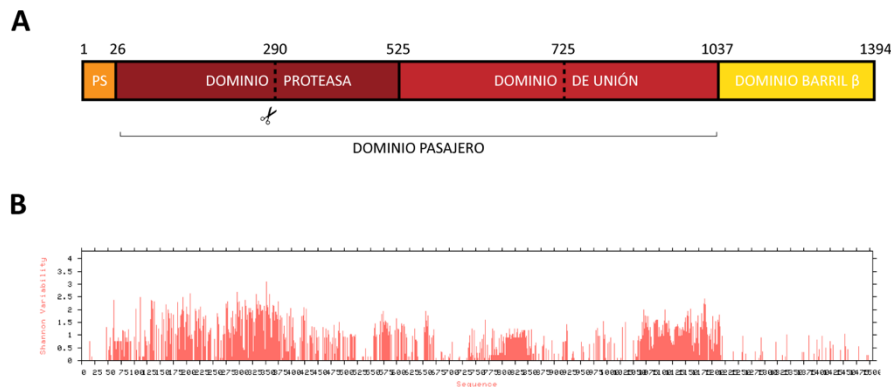


Figura 15. Estructura y variabilidad de la proteína Hap en HiNT. (A) Esquema de los dominios funcionales de la proteína Hap en base al alelo presente en la cepa N187, aislado de *H. influenzae* en el que esta proteína fue inicialmente caracterizada (St. Geme & Falkow 1994). (B) Representación gráfica de la variabilidad de Hap utilizando un alineamiento múltiple de todas las secuencias proteicas de los aislados (exceptuando las cepas P589 y P590 que presentan un alelo truncado). El gráfico se ha realizado con una herramienta bioinformática online (imed.med.ucm.es/PVS/) (García-Boronat *et al.* 2008).

Como se observa en la **Tabla C1** (Anexo III), la diversidad alélica de Hap está asociada a la clonalidad de las cepas. Existen 30 grupos clonales en los que sus cepas presentan el mismo alelo de Hap por grupo clonal, estando el grupo clonal integrado por una (16 grupos clonales) o por más de una cepa (14 grupos clonales). Contrariamente, los grupos clonales 8, 16 y 25 contienen cepas que presentan distintos alelos de Hap.

No se identificó una asociación paciente-alelo de Hap, ya que un mismo paciente puede presentar distintos aislados, cada uno correspondiente a un periodo de exacerbación, con alelos de Hap iguales o distintos. Esta observación puede deberse a la naturaleza policlonal de la infección de HiNT en estos pacientes. Dado que HiNT es un patógeno oportunista, diferentes cepas coexisten en el pulmón EPOC, y cada cepa aislada corresponde posiblemente a la más prevalente en ese momento (ejemplo: el paciente 1 tiene 5 aislamientos, y estas cepas contienen 4 alelos Hap diferentes). Además, un mismo alelo de Hap puede estar presente en diferentes aislados de pacientes distintos, posiblemente debido a la transmisión de cepas entre pacientes (ejemplo: el alelo 11 está presente en cepas de 4 pacientes diferentes). Por lo general, cepas con el mismo alelo de Hap se encuentran agrupadas dentro del mismo grupo clonal, con la excepción del alelo 21, que está presente en cepas de los grupos clonales 18 y 26, sugiriendo eventos de transmisión horizontal de genes entre aislados.

En conjunto, todas las cepas HiNT analizadas tienen el gen *hap*, independientemente de su capacidad autoagregativa. Además, esta proteína presenta una alta diversidad, y no se identificaron alelos específicos relacionados con la capacidad para autoagregar de los aislados. Así, la variabilidad alélica de Hap no se asocia directamente, en las condiciones testadas, con el fenotipo autoagregativo de HiNT.

2.3. Escrutinio de aislados clínicos de HiNT hiperinvasores en el epitelio respiratorio humano

La cepa HiNT 86-028 NP es un aislado clínico de otitis media que presenta características de cepa hiperinvasora en epitelio respiratorio humano. Trabajos previos del grupo de investigación

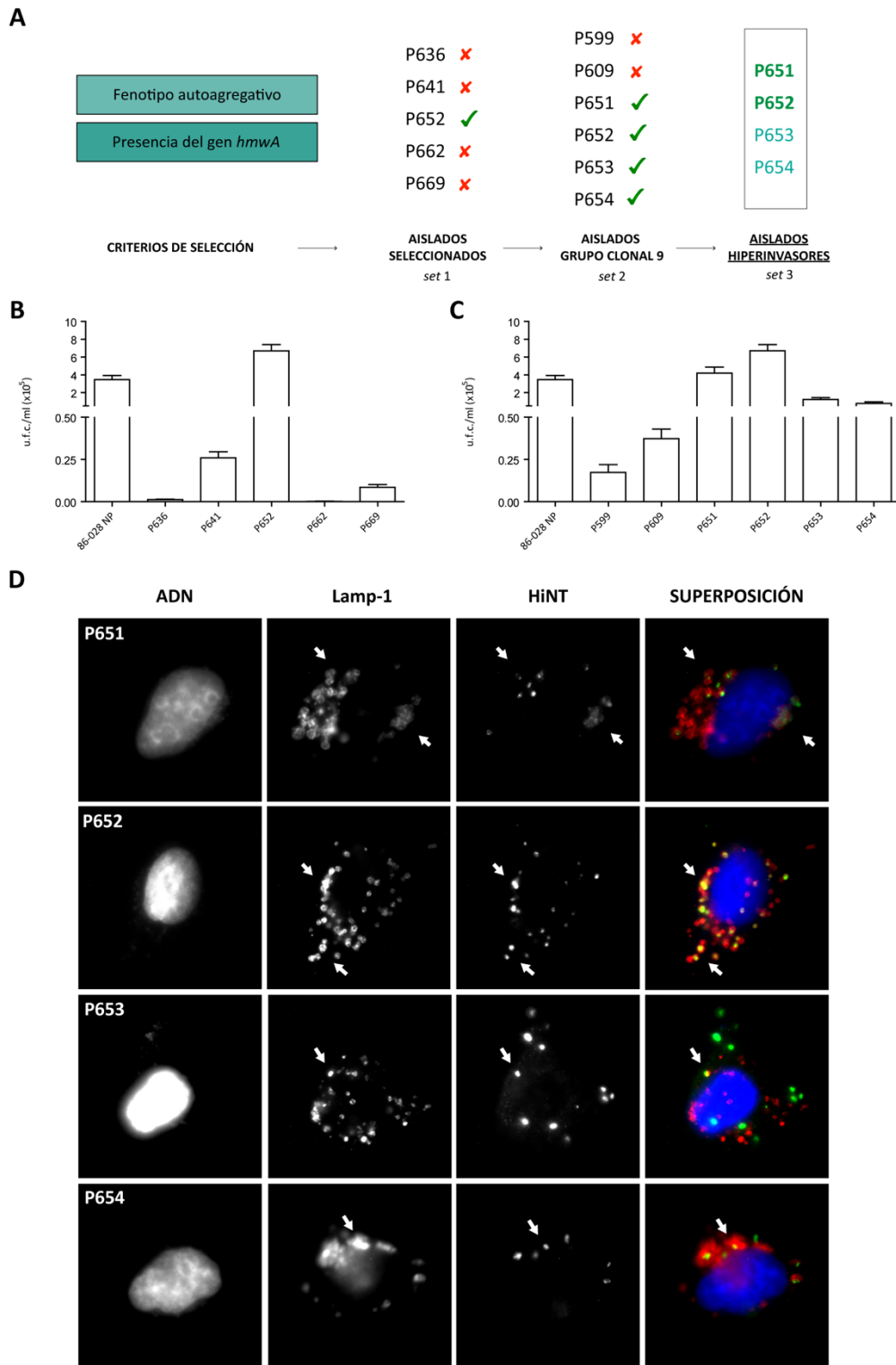


Figura 16. Escrutinio de la colección de aislados clínicos EPOC para identificar cepas de HiNT con fenotipo hiperinvasor. (A) Flujo de trabajo para la identificación de aislados hiperinvasores. Se seleccionó un primer set de cepas candidatas. Se identificó una cepa hiperinvasora, P652. Se seleccionó un nuevo set de cepas candidatas con los aislados del grupo clonal 9. Finalmente, el conjunto de aislados hiperinvasores quedó integrado por P651, P652, P653 y P654. **(B)** Niveles de invasión del epitelio respiratorio por el primer grupo de cepas candidatas. **(C)** Niveles de invasión del epitelio respiratorio por el segundo grupo de cepas candidatas. **(D)** Imágenes de inmunofluorescencia correspondientes a ensayos de invasión de células A549 depositadas en cubreobjetos de vidrio. El ADN se tiñó con el agente intercalante Hoechst 33342 (azul). Los compartimentos celulares con características de endosoma tardío se tiñeron con el Ab 1º ratón-anti-LAMP-1 y el Ab 2º burro-anti-ratón conjugado con RRX (rojo). Las bacterias (HiNT) se tiñeron con el Ab 1º conejo-anti-HiNT y el Ab 2º burro-anti-conejo conjugado con Alexa 488 (verde). Algunos de los eventos de co-localización bacteria:Lamp-1 se señalan mediante las flechas.

han descrito este fenotipo hiperinvasor, presente en cepas que se caracterizan por (i) autoagregar, (ii) presentar una tasa elevada de adhesión epitelial, (iii) presentar una alta tasa de invasión epitelial, (iv) presentar un alto porcentaje de bacterias que, una vez internalizadas, se localizan en compartimentos subcelulares de tipo endosoma tardío (Mell *et al.* 2016).

A continuación, se realizó un escrutinio de aislados hiperinvasores en la colección de cepas clínicas de HiNT en estudio. Evidencias previas apuntan que HmwA está involucrada en el fenotipo hiperinvasor de *H. influenzae*, más concretamente en la capacidad autoagregativa de las cepas. Por ello, se seleccionó un primer *set* de cepas que (i) autoagregan (**Apartado 1.2**), y (ii) presentan en su genoma los genes *hmw1A* y *hmw2A* (**Tabla 9**). Siguiendo estos criterios, la selección se enfocó en cepas con genoma secuenciado mediante la tecnología PacBio, para disponer de las secuencias de estos genes con la mayor certeza posible (**Figura 16A**).

Así, se seleccionaron las cepas P636, P641, P652, P662 y P669. Se realizaron ensayos de invasión epitelial en células A549, usando HiNT 86-028NP como control positivo de fenotipo hiperinvasor. En el caso del aislado P652, se obtuvieron índices de invasión comparables a los de 86-028NP (**Figura 16B**). Este aislado pertenece al grupo clonal 9 (**Tabla 9**), en el que también se incluyen las cepas P599, P609, P651, P653 y P654. P599 y P609, aisladas de los pacientes 4 y 5, respectivamente, presentaron niveles de invasión epitelial menores a los de HiNT 86-028NP. P651, P652, P653 y P654, aisladas del paciente 10, presentaron tasas altas (P651 y P652 comparables a 86-028NP) y medias (P653 y P654) de invasión epitelial. De hecho, los niveles de invasión epitelial de P652 son significativamente mayores a los de 86-028NP ($p < 0,001$) (**Figura 16C**).

A continuación, se realizaron ensayos de invasión epitelial en células A549 depositadas sobre cubreobjetos de vidrio e inmunomarcaje para evaluar los eventos de co-localización intracelular (**Apartado 13**, Materiales y Métodos). En las infecciones con P651 y P652, se utilizó una MOI 1:1, mientras que en las infecciones con P653 y P654, se empleó una MOI 100:1. Se observó que, con P651, P652, P653 y P654, la mayoría de bacterias localizaron en compartimentos subcelulares que expresan el marcador Lamp-1, característico de endosoma tardío (**Figura 16D**).

2.4. Papel de HmwA en la hiperinvasión del epitelio respiratorio por HiNT

Trabajos previos del grupo de investigación sugieren que determinados alelos de *hmw1A* están involucrados en el fenotipo hiperinvasor de HiNT (Mell *et al.* 2016).

Analizando el entorno genómico de la cepa HiNT 86-028NP, se observó que el operón *hmw1ABC* se localiza en un locus adyacente al gen *yrbA*, mientras que el operón *hmw2ABC* está en un locus proximal al gen *radA*, al igual que en la cepa 12 de HiNT (Barenkamp & Leininger 1992). La **Tabla 10** muestra los porcentajes de identidad entre adhesinas de ambas cepas, en base a alineamientos dos a dos realizados con la herramienta *online Pairwise Sequence Alignment* EMBOSS Needle (ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle). De este modo, se determinó que en la cepa P652, el entorno genómico del operón *hmw1ABC* es *radA*-proximal, y el del operón *hmw2ABC* es *yrbI*-adyacente, como se ha descrito previamente para la cepa HiNT375 (Mell *et al.* 2016).

Tabla 10. Análisis comparado de la secuencia proteica de las adhesinas HmwA_{P652} con sus parálogos en 86-028NP. Se representa el porcentaje de identidad a nivel de secuencia nucleotídica basado en alineamientos EMBOSS Needle.

Locus	Cepa	Hmw1A _{86-028NP}	Hmw2A _{86-028NP}	Mejor hit
<i>yrbI</i> -adyacente	86-028NP	100%	69,0%	<i>hmw1A</i>
	P652	65,0%	70,7%	<i>hmw2A</i>
<i>radA</i> -proximal	86-028NP	69,0%	100%	<i>hmw2A</i>
	P652	90,6%	67,0%	<i>hmw1A</i>

Se extrajo la secuencia nucleotídica de *hmw1A* y *hmw2A* de la cepa P652. $Hmw1A_{P652}$ tiene un peso molecular (*Molecular weight*, Mw) predicho de 162,796 kDa, y $Hmw2A_{P652}$ tiene un Mw de 167,846 kDa. Las predicciones de Mw se realizaron mediante la herramienta bioinformática *online* ExPASy (web.expasy.org/compute_pi/). Extractos celulares de las cepas hiperinvasoras y la cepa control 86-028NP fueron preparados y utilizados para analizar la traducción de HmWA mediante *western blotting*. Se empleó el anticuerpo primario cobaya-anti-HmWA (gp85), que se une de forma específica a las proteínas Hmw1A y Hmw2A. En cuanto a Hmw1A, se observó una mayor cantidad de proteína en las cepas P651 y P652 respecto a las cepas P653 y P654. Respecto a Hmw2A, no se observaron diferencias en los niveles proteicos entre las 4 cepas. La cepa 86-028NP presenta únicamente la banda correspondiente a Hmw1A (**Figura 17A**).

Cantidades elevadas de Hmw1A se relacionan con niveles altos de invasión del epitelio respiratorio. Existen evidencias que detallan una regulación de los niveles de expresión de *hmw1A* y *hmw2A* mediante variación de fase (Cholon *et al.* 2008). La variación de fase viene determinada por un número variable de repeticiones en tándem del hepta-nucleótido 5'ATCTTTC3' en el promotor de ambos genes (Dawid *et al.* 1999), que también se relaciona con la persistencia de HiNT en el pulmón EPOC. Así, a mayor número de estas repeticiones, mayor es la persistencia de la cepa, y menor es la expresión de *hmwA*. Las cepas P651, P652, P653 y P654 presentan niveles invasión epitelial diferentes entre sí. Un análisis previo de las regiones génicas codificantes (*Open Reading Frames*, ORFs) determinó que no existen SNPs entre estas cepas, por lo que las diferencias observadas en el fenotipo invasor no vienen determinadas por polimorfismos en regiones codificantes. No obstante, este análisis no comparó las regiones intergénicas, por lo que polimorfismos en regiones promotoras pueden ser responsables de las diferencias fenotípicas observadas. Por ello, los promotores de *hmw1A* y *hmw2A* de las cepas P651, P652, P653 y P654 fueron secuenciados utilizando los cebadores p_hmw1A_seq_F y p_hmw1A_seq_R y los p_hmw1A_seq_F y p_hmw1A_seq_R. Las secuencias promotoras de ambos genes se extrajeron del genoma de referencia de 86-028NP depositado en la base de datos de NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/genome/165?genome_assembly_id=299369). En el **Anexo III**, se detalla la secuencia de ambas regiones promotoras en el conjunto de las cepas de trabajo, así como el número de repeticiones del hepta-nucleótido responsable de la variación de fase. El número de repeticiones en el promotor del gen *hmw2A* es similar en las cepas P651, P652, P653 y P654, y no se observan diferencias en los niveles de proteína. En el caso de *hmw1A*, el número de repeticiones en P651 y P652 es menor que en P653 y P654, lo que se traduce en niveles decrecientes de Hmw1A entre la primera y última cepa de este set (**Figura 17B**).

Para relacionar la variación de fase en las regiones promotoras de los genes que codifican las adhesinas HmWA con una expresión diferencial de las mismas, se cuantificaron los niveles de expresión de los genes *hmw1A* y *hmw2A* en P651, P652, P653, P654. Se realizaron extracciones de ARN de cultivos crecidos en sBHI hasta $DO_{600} = 0,5$ de estas cepas, así como de 86-028NP, que se empleó como cepa hiperinvasora control. Las cantidades relativas de ARNm de los genes *hmw1A* y *hmw2A* se midieron mediante qPCR. Para P651, P652, P653, P654, se emplearon los cebadores hmw1A_F + hmw1A_R en el caso de *hmw1A*, y hmw2A_F + hmw2A_R para *hmw2A*, diseñados a partir de la secuencia de los genes en P652. Para 86-028NP, se utilizaron los cebadores hmw1A_F + hmw1A_R en el caso de *hmw1A*, y hmw2A_F_NP + hmw2A_R_NP para *hmw2A*. P651 y P652 presentaron mayores niveles de expresión de *hmw1A* que P653 y P654. En cambio, no se observaron diferencias significativas en la expresión del gen *hmw2A* entre aislados. En 86-028NP, se observó producción de ARNm del gen *hmw1*, pero no de *hmw2A* (**Figura 17C y 17D**).

En conjunto, estos datos muestran variación de fase en el promotor de *hmw1A* asociada al fenotipo hiperinvasor observado durante la infección epitelial por HiNT. Esto se traduce en un aumento de repeticiones en esta región promotora, que conlleva una menor expresión del gen, asociada a una menor traducción de la proteína y a su vez, a un menor nivel de invasión epitelial.

De este modo, una mayor expresión de *hmw1A* en P651 y P652 respecto P653 y P654 puede explicar las diferencias en el fenotipo hiperinvasor de estos aislados clínicos de HiNT.

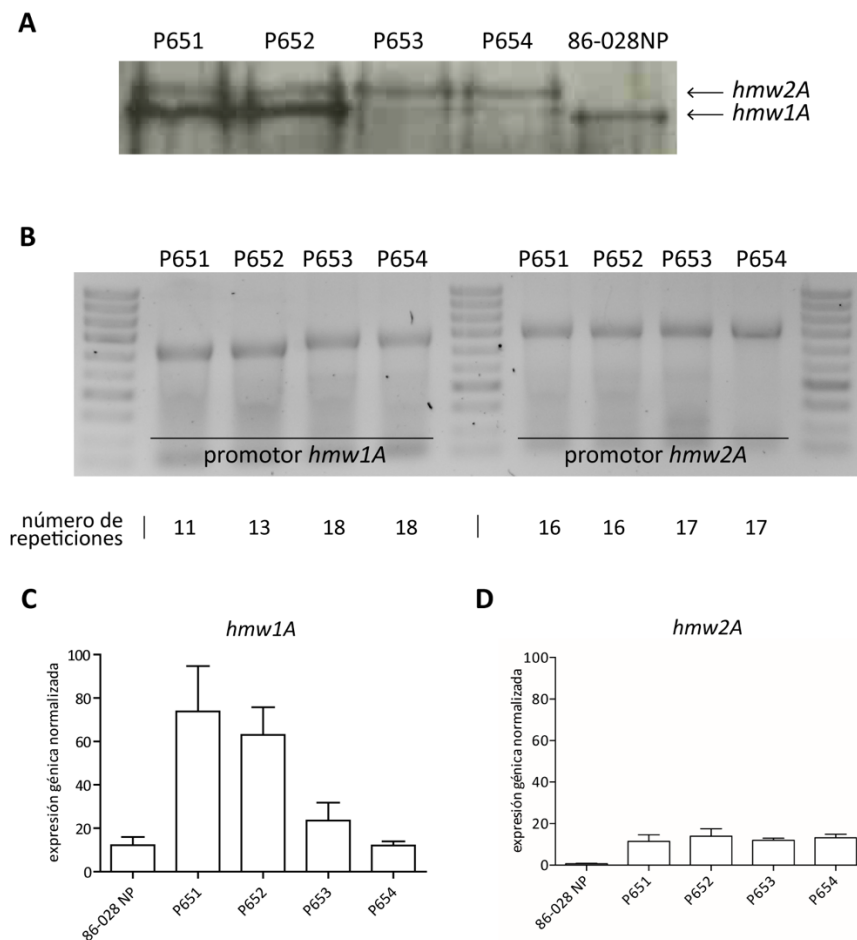


Figura 17. Caracterización de *hmw1A* y *hmw2A* en las cepas clínicas P651, P652, P653 y P654. (A) Niveles de Hmw1A y Hmw2A en extractos celulares de las cepas de estudio analizado mediante *western blot* con un anticuerpo anti-HmwA. **(B)** Separación electroforética de los productos de PCR resultantes de amplificar la región 3' de los promotores de *hmw1A* y *hmw2A* en un gel de agarosa 1%. Se indica el número de repeticiones del heptanucleótido 5'ATCTTTC3' determinado mediante secuenciación. **(C)** Niveles de expresión del gen *hmw1A*. **(D)** Niveles de expresión del gen *hmw2A*.

2.5. Monitorización de la vida intracelular de HiNT en el epitelio respiratorio

Se ha identificado un aislado hiperinvasor en la colección de cepas clínicas de HiNT en estudio, P652, que se caracteriza por presentar altos niveles de invasión en el epitelio respiratorio humano. Por otro lado, la vida intracelular de HiNT en compartimentos subcelulares se ha descrito previamente para la cepa no hiperinvasora HiNT375 (Morey *et al.* 2011). En este trabajo, se ha analizado la localización intracelular de las cepas hiperinvasoras P652 y 86-028NP mediante infección de 2 h y observación de la vida intracelular de ambas cepas en una ventana temporal que varía entre 2 y 24 h de tratamiento con gentamicina.

Tras 2 h de infección, la localización intracelular se analizó a tiempos variables en medio RPMI con gentamicina (t = 1, 2, 4, 6, 8 y 24 h). Seguidamente, las células epiteliales se lisaron y se preparó un banco de diluciones en PBS1X que se plaqueó en sBHI agar para el recuento de u.f.c. viables. Se observa que la infección inicial fue mayor por parte de la cepa P652 que 86-028NP. A partir de 2 h post-infección, el número de bacterias intracelulares se redujo

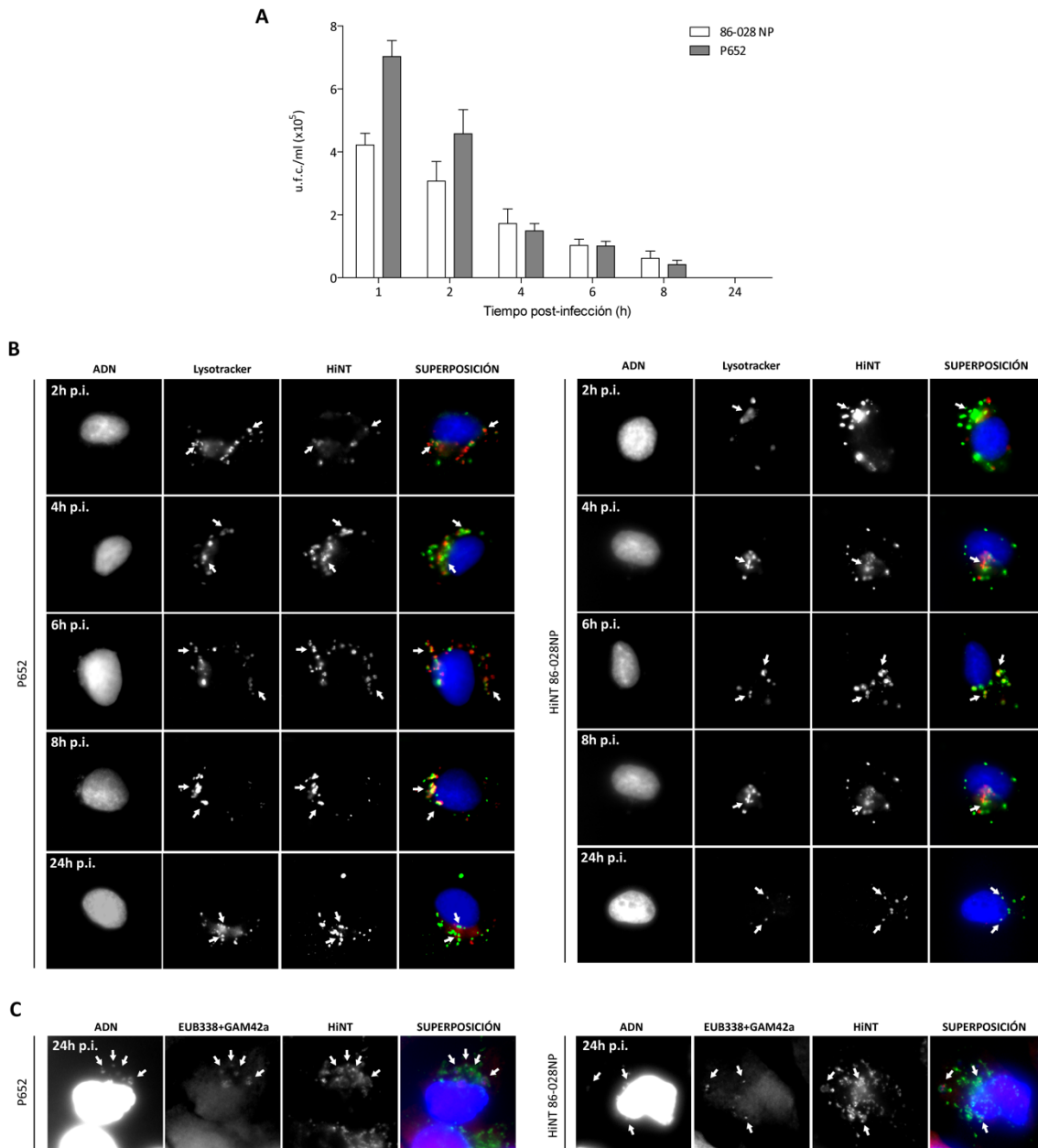


Figura 18. Monitorización de la vida intracelular de HiNT en células A549. (A) Experimento de invasión y vida intracelular epitelial mediante recuento de u.f.c. viables a tiempos variables de infección. Las células estuvieron 2 h en contacto con HiNT; tras este tiempo se realizaron varios tiempos de infección ($t = 1, 2, 4, 6, 8$ y 24 h) manteniendo las bacterias con gentamicina, observando una caída progresiva en el número de u.f.c./ml. **(B)** Imágenes de inmunofluorescencia correspondientes a ensayos de infección en células A549 depositadas en cubreobjetos de vidrio durante tiempos de infección variable ($t = 2, 4, 6, 8$ y 24 h). El ADN se tiñó con el agente intercalante Hoechst 33342 (azul). Las bacterias (HiNT) se tiñeron con el Ab 1^o conejo-anti-HiNT y con el Ab 2^o burro-anti-conejo conjugado con Alexa 488 (verde). Los compartimentos subcelulares ácidos se marcaron con 0,5 μ M Lysotracker RedDN99/pocillo 45 min antes de la fijación (rojo). Algunos eventos de co-localización bacteriana en compartimentos subcelulares con pH ácido se han señalado con flechas blancas. **(C)** Presencia de bacterias metabólicamente activas pero no cultivables a tiempos prolongados de infección epitelial por HiNT. Se utilizó la técnica FISH, empleando las sondas fluorescentes EUB338 y Gam42a para marcar de forma específica el ARNr bacteriano. Se señalan bacterias intracelulares metabólicamente activas con flechas blancas.

progresivamente de modo paralelo en ambas cepas, hasta llegar a niveles no detectables a 24 h post-infección (**Figura 18A**).

Estas mismas infecciones se realizaron en células A549 depositadas sobre cubreobjetos de vidrio, que se procesaron para su análisis mediante microscopía de inmunofluorescencia. En este caso, se utilizó una MOI 10:1. El marcador fluido *Lysotracker RedDN99* se utilizó para marcar compartimentos subcelulares con pH ácido. Así, se analizó la naturaleza de los compartimentos

en los que se localiza HiNT durante tiempos prolongados en el epitelio respiratorio. Ambas cepas evolucionaron intracelularmente de modo paralelo, observándose una disminución de la carga bacteriana intracelular a lo largo del tiempo. Ambas cepas co-localizan de forma similar en compartimentos subcelulares ácidos. Esta co-localización en compartimentos ácidos se observó en todos los tiempos post-infección analizados (**Figura 18B**).

Por otro lado, se observa una divergencia importante entre el recuento bacteriano en placa y el análisis mediante microscopía de fluorescencia a 24 h post-infección. A este tiempo, no se plaquearon bacterias en sBHI agar, si bien, se observaron bacterias dentro de las células A549 mediante microscopía. Para determinar la viabilidad de estas bacterias intracelulares, se marcaron los ribosomas bacterianos mediante FISH, utilizando las sondas EUB338 y Gam42a, específicas para las subunidades de ARNr bacteriano 16S y 23S, respectivamente (**Apartado 14, Materiales y Métodos**). De este modo, se observaron bacterias metabólicamente activas, pero no cultivables, tras tiempos largos de infección epitelial (24 h) (**Figura 18C**).

Estas observaciones apuntan a un mecanismo de supervivencia intracelular no replicativa de cepas hiperinvasoras de HiNT en células del epitelio respiratorio similar al descrito previamente para aislados no hiperinvasores (Morey *et al.* 2011).

3. ANÁLISIS DEL PAPEL DE GlpQ DURANTE LA INFECCIÓN RESPIRATORIA POR *H. influenzae*

3.1. Generación de cepas HiNT carentes del gen *glpQ*

Dos cepas de *H. influenzae* con distinto origen patológico, RdKW20 y HiNT375, fueron utilizadas para generar mutantes isogénicos en *glpQ* ($\Delta glpQ$). Se empleó la estrategia de interrupción génica por doble recombinación homóloga con un *cassette* que contiene un gen *Spec^r*, como se detalla en el **Apartado 10.1** (Materiales y Métodos). Estos mutantes se caracterizaron para estudiar el papel de la fosfodiesterasa GlpQ durante la infección del epitelio respiratorio humano por HiNT. HiNT375 es un aislado clínico de otitis media crónica utilizado en el grupo de investigación por su naturaleza patogénica (**Tabla A1**, Anexo I).

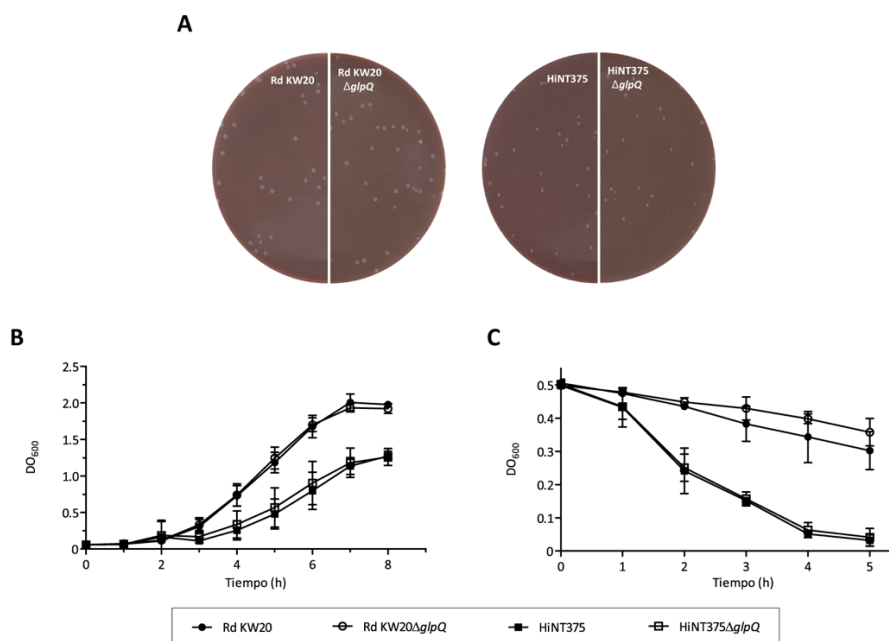


Figura 19. Crecimiento y autoagregación de las cepas RdKW20, RdKW20 $\Delta glpQ$, HiNT375 y HiNT375 $\Delta glpQ$. (A) Las cepas se crecieron en agar chocolate. Cien μ l de la dilución (-6) de un *input* bacteriano ajustado a $DO_{600} = 1$ fueron plaqueados en sBHI, obteniendo colonias separadas de aspecto similar cepa silvestre-cepa mutante. (B) Curvas de crecimiento de las 4 cepas que recogen los cambios de DO_{600} durante 8 h, en intervalos de 1 h ($t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$ y 8 h). (C) Autoagregación de las cepas silvestres y mutantes $\Delta glpQ$. Suspensiones bacterianas realizadas en PBS1X a $DO_{600} = 0,5$ fueron preparadas a partir de la biomasa de cada cepa crecida en agar chocolate. La caída de DO_{600} se monitorizó en la parte superior de la columna, que permaneció estática durante 5 h ($t = 0, 1, 2, 3, 4$ y 5 h)

RdKW20, RdKW20 $\Delta glpQ$, HiNT375 y HiNT375 $\Delta glpQ$ se crecieron en agar chocolate a 37°C y 5% CO_2 . La biomasa se recogió en PBS1X y se ajustó a $DO_{600} = 1$. La suspensión bacteriana se utilizó para preparar diluciones seriadas que se plaquearon en sBHI agar. El tamaño y la morfología de las colonias de las cepas mutantes respecto sus respectivas silvestres fue similar (**Figura 19A**). La dinámica de crecimiento de las 4 cepas fue analizada en sBHI durante 8 h. No se observaron diferencias entre cepas (**Figura 19B**). Por otra parte, RdKW20 y RdKW20 $\Delta glpQ$ no muestran fenotipo autoagregativo, mientras que HiNT375 y HiNT375 $\Delta glpQ$ autoagregan, y lo hacen de forma similar (**Figura 19C**).

3.2. Relación entre GlpQ y PCho en *H. influenzae*

La fosfodiesterasa GlpQ se encarga de hidrolizar las moléculas GPC y PAF, presentes en el huésped eucariota, liberando al medio extracelular la molécula de colina, que es a su vez

captada por *H. influenzae* e incorporada a su molécula del LOS a través de las proteínas codificadas por el operón *lic1ABCD*.

El nivel de PCho presente en la superficie de RdKW20, RdKW20 Δ *glpQ*, HiNT375 y HiNT375 Δ *glpQ* fue analizado cualitativamente mediante *colony blot*. Se utilizó como control negativo la cepa HiNT375 Δ *lic1BC*, que carece de dos genes del operón implicado en la captación y activación de colina desde el medio extracelular. La señal observada en ambos mutantes Δ *glpQ* fue menor que la de sus respectivas cepas silvestres, mientras que fue nula en HiNT375 Δ *lic1BC* (**Figura 20A**). Además, la cantidad de PCho de las cepas se determinó mediante citometría de flujo, obteniendo resultados similares a los del ensayo de inmunodetección en colonia, siendo la cantidad de PCho en la superficie de RdKW20 Δ *glpQ* significativamente menor a RdKW20 ($p < 0,0001$) (**Figura 20B**). De este modo, la ausencia del gen *glpQ* se asocia a una menor decoración de la superficie bacteriana con PCho.

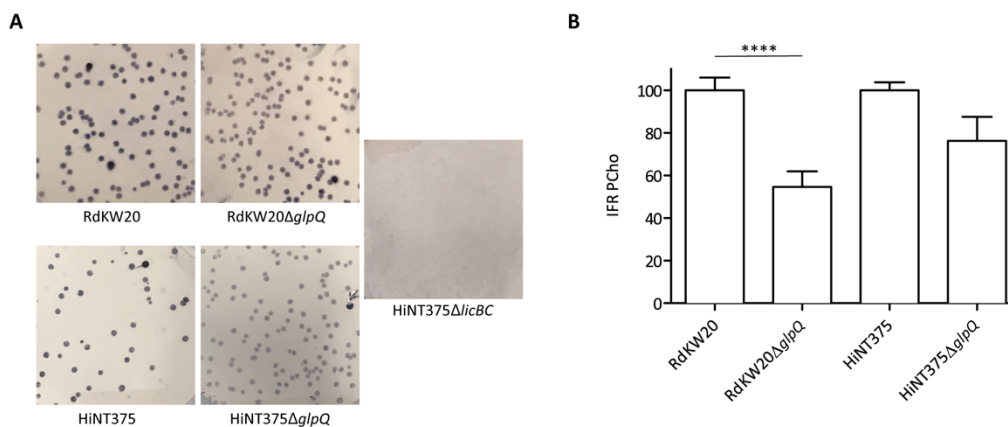


Figura 20. GlpQ modula los niveles de PCho en RdKW20 y HiNT375. (A) *Colony blot* de las cepas RdKW20, RdKW20 Δ *glpQ*, HiNT375, HiNT375 Δ *glpQ* y HiNT375 Δ *licBC*. **(B)** Inmunofluorescencia relativa (IFR) de bacterias incubadas con el anticuerpo TEPC-15 anti-PCho. La unión específica de este anticuerpo a las moléculas de PCho de las bacterias se analizó mediante citometría de flujo. **** $p < 0,0001$.

3.3. Implicación de GlpQ en la resistencia de *H. influenzae* a péptidos antimicrobianos

La presencia de fosforilcolina en el LOS de *H. influenzae* está relacionada con la persistencia de esta bacteria en la mucosa respiratoria. Esta decoración de la superficie bacteriana se asocia con un descenso de la susceptibilidad a los péptidos antimicrobianos secretados en las vías respiratorias inferiores (Lysenko *et al.* 2000b). La fosfodiesterasa GlpQ, al relacionarse directamente con la cantidad de PCho en *H. influenzae*, podría estar involucrada en la resistencia de HiNT a péptidos antimicrobianos. La susceptibilidad a colistina, un péptido antimicrobiano catiónico, fue evaluada en ambas cepas de *H. influenzae*, así como en sus respectivos mutantes Δ *glpQ*. Las cepas silvestres RdKW20 y HiNT375 presentaron mayor resistencia a colistina que sus respectivos mutantes isogénicos Δ *glpQ* (0,47-0,64; frente a 0,64 μ g/ml; 0,94 frente a 0,32 μ g/ml) (**Figura 21**). Así, GlpQ juega un papel, al menos parcial, en la resistencia de RdKW20 y HiNT375 a colistina.

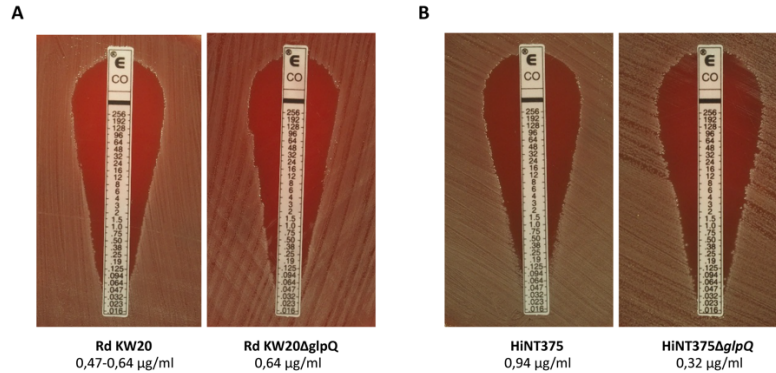


Figura 21. Determinación de la CMI del péptido antimicrobiano colistina en cepas de *H. influenzae* silvestres y mutantes $\Delta glpQ$. A partir de suspensiones bacterianas normalizadas a 0,5 McFarley en suero fisiológico, se determinó la CMI de colistina en placas de MHF agar mediante tiras E-test con concentraciones de colistina entre 256 y 0,016 $\mu\text{g}/\text{m}$. Se analizaron **(A)** RdKW20 y **(B)** HiNT375.

3.4. Papel de GlpQ en la infección del epitelio respiratorio por *H. influenzae*

La proteína GlpQ está relacionada con la cantidad de PCho con la que *H. influenzae* decora su membrana externa, y podría estar implicada en la infección del epitelio respiratorio por *H. influenzae*, por lo que se realizaron ensayos de infección *in vitro* e *in vivo* para estudiar esta asociación.

Se realizaron experimentos de infección de células epiteliales A549. La capacidad de adhesión de las cepas RdKW20 y HiNT375 fue evaluada, paralelamente la de sus mutantes (**Figura 22A**). En ensayos de invasión, las cepas utilizadas fueron HiNT375 y HiNT375 $\Delta glpQ$ (**Figura 22B**). RdKW20 presenta índices de invasión bajos, por lo que el efecto de la pérdida del gen *glpQ* en esta casi nula capacidad invasiva puede ser difícil de determinar. Las cepas mutantes se adherieron e invadieron el epitelio de forma similar a las silvestres.

La respuesta inmune de un organismo es compleja y múltiple, por lo que un modelo animal tiene gran validez al evaluar si un gen está relacionado con patogénesis. Se utilizó un modelo murino, infectando ratones CD1 intranasalmente con cantidades comparables de HiNT375 y HiNT375 $\Delta glpQ$ (10^8 u.f.c./ratón). Los animales se sacrificaron a 24 y 48 h post-infección (hpi). Se recogió LBA; asimismo, los pulmones de cada animal se diseccionaron y procesaron. LBA y pulmones fueron plaqueados en sBHI agar para recuento de u.f.c. viables (**Figura 22C**). En pulmón, se observaron diferencias significativas entre los recuentos correspondientes a las cepas silvestre y mutante, a 24 y a 48 hpi ($p < 0,05$) (**Figura 22D**). En LBA, hubo diferencias significativas entre cepas silvestre y mutante en el primer tiempo de sacrificio ($p < 0,01$) (**Figura 22E**). Estos resultados sugieren que GlpQ contribuye a la infección pulmonar por HiNT.

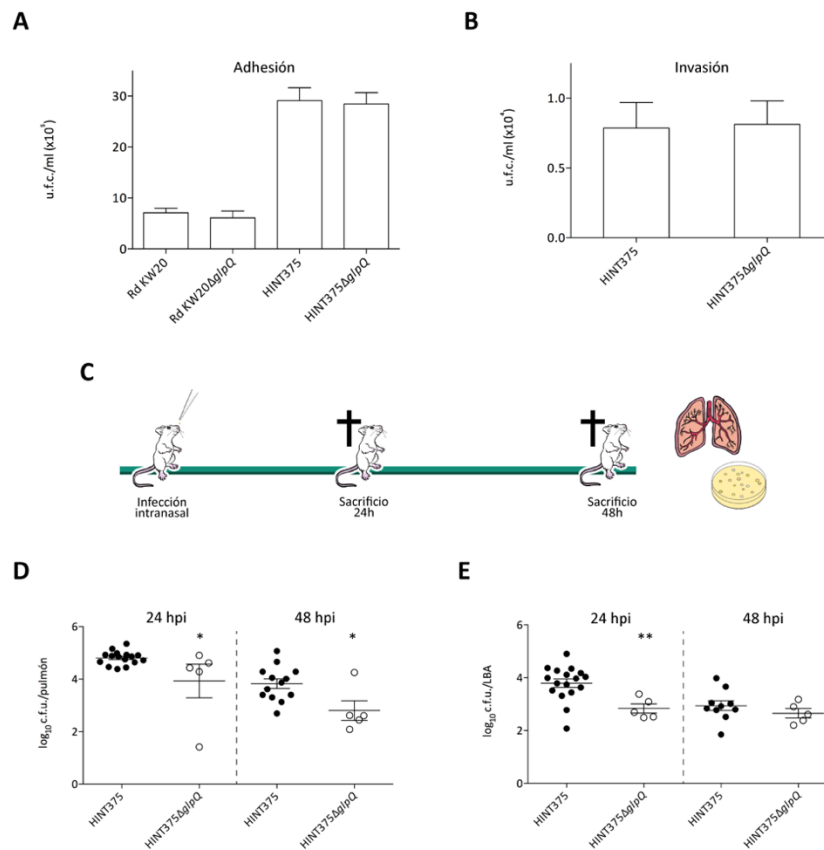


Figura 22. Contribución de GlpQ a la infección por *H. influenzae*. (A) Análisis comparativo de los índices de adhesión a células A549 de las cepas RdKW20 y HiNT375 frente a sus mutantes. (B) Análisis comparativo de los índices de invasión de células A549 por HiNT375 silvestre y $\Delta glpQ$. (C) Infección de HiNT375 y HiNT375 $\Delta glpQ$ en un modelo de infección intranasal murino. Ratones CD1 hembra de 20-22 g fueron infectados con cada cepa. (D) Recuento de u.f.c. viables obtenidos en pulmón tras 24 hpi (izquierda) y 48 hpi (derecha). (E) Recuento de u.f.c. viables obtenidos en LBA tras 24 hpi (izquierda) y 48 hpi (derecha).

3.5. Diversidad alélica de GlpQ en la colección de aislados clínicos de HiNT en estudio

La infección causada por HiNT en el pulmón del paciente EPOC resulta, en términos de efectividad de tratamiento, un gran desafío para las políticas sanitarias nacionales. El paciente EPOC recibe habitualmente tratamiento antibiótico intermitente, anti-inflamatorio y/o dual antibiótico/anti-inflamatorio (Vogelmeier *et al.* 2017). No obstante, el régimen terapéutico actual presenta varias limitaciones, entre ellas el desarrollo de resistencias antibióticas, por lo que resulta un aspecto prioritario la identificación de nuevas dianas terapéuticas, así como el desarrollo de tratamientos alternativos eficaces. GlpQ es una enzima con actividad fosfodiesterasa expuesta en la superficie de HiNT, cuyo potencial terapéutico ha sido explorado en este trabajo.

En primer lugar la variabilidad alélica de GlpQ fue estudiada. Para ello, se utilizaron los genomas disponibles de la colección de cepas clínicas de HiNT aisladas de pacientes EPOC, descrita en el **Apartado 2.1**. La secuencia del gen *glpQ* de las 91 cepas de la colección de aislados se extrajo de sus genomas y fue traducida para analizar la diversidad alélica. Cuatro cepas no tienen el gen *glpQ* en su genoma; P593, P643, P644 y P645. Al comparar las secuencias de aminoácidos, se identificaron 18 variantes alélicas de GlpQ en 87 aislados de HiNT (**Tabla 11**). Se realizó un alineamiento múltiple de los 18 alelos empleando la herramienta online Clustal Omega (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo). Se encontró un total de 21 SNPs, 11 de ellos ya descritos con anterioridad en otras cepas (uniprot.org/uniprot/Q06282) y 10 de nueva descripción. El

alineamiento múltiple, así como los polimorfismos entre las secuencias de las variantes de GIpQ se muestran en el **Anexo IV**.

Tabla 11. Distribución alélica de GIpQ en la colección de aislados clínicos de HiNT.

Grupo clonal	Cepa	Paciente	Alelo GIpQ	Longitud de la proteína (aa)	Peso molecular predicho (kDa)
1	P588	1	1	364	41,82091
	P604	5	1	364	41,82091
	P605	5	1	364	41,82091
	P641	10	1	364	41,82091
	P642	10	1	364	41,82091
2	P589	1	2	364	41,77484
	P590	1	2	364	41,77484
3	P591	1	3	364	41,87398
4	P592	1	4	364	41,76882
5	P593	2	-	-	-
6	P594	2	5	364	41,78986
	P595	2	5	364	41,78986
	P596	2	5	364	41,78986
	P650	10	5	364	41,78986
7	P597	2	6	364	41,75486
8	P598	4	1	364	41,82091
	P631	8	1	364	41,82091
	P662	12	1	364	41,82091
	P663	12	1	364	41,82091
9	P599	4	1	364	41,82091
	P609	5	1	364	41,82091
	P651	10	1	364	41,82091
	P652	10	1	364	41,82091
	P653	10	1	364	41,82091
	P654	10	1	364	41,82091
10	P600	4	7	364	41,86501
	P601	4	7	364	41,86501
	P602	4	7	364	41,86501
	P612	6	7	364	41,86501
	P613	6	7	364	41,86501
	P614	6	7	364	41,86501
	P615	6	7	364	41,86501
	P616	6	7	364	41,86501
	P618	6	7	364	41,86501
	P620	7	7	364	41,86501
	P621	7	7	364	41,86501
	P622	7	7	364	41,86501
	P623	7	7	364	41,86501
	P624	7	7	364	41,86501
P629	8	7	364	41,86501	
P632	8	7	364	41,86501	
P633	8	7	364	41,86501	
11	P603	5	8	364	41,79483
12	P606	5	9	364	41,7869
13	P607	5	10	364	41,80896
	P608	5	10	364	41,80896
14	P610	6	1	364	41,82091
15	P611	6	11	364	41,867
16	P617	6	1	364	41,82091
	P634	9	1	364	41,82091
	P635	9	1	364	41,82091
	P636	9	1	364	41,82091
	P637	9	1	364	41,82091
	P667	13	1	364	41,82091
	P668	13	1	364	41,82091
	P669	13	1	364	41,82091
	P676	14	1	364	41,82091
	P679	14	1	364	41,82091
P853	14	1	364	41,82091	

Grupo clonal	Cepa	Paciente	Alelo GlpQ	Longitud de la proteína (aa)	Peso molecular predicho (kDa)
17	P619	6	1	364	41,82091
	P638	10	1	364	41,82091
18	P625	7	1	364	41,82091
	P673	13	1	364	41,82091
19	P626	7	12	364	41,85794
20	P627	8	1	364	41,82091
	P628	8	1	364	41,82091
21	P630	8	1	364	41,82091
22	P639	10	13	364	41,84897
24	P640	10	14	364	41,79792
	P643	10	-	-	-
	P644	10	-	-	-
25	P645	10	-	-	-
	P646	10	13	364	41,84897
	P647	10	13	364	41,84897
	P648	10	13	364	41,84897
26	P649	10	13	364	41,84897
	P656	11	13	364	41,84897
27	P657	11	15	364	41,90702
	P658	11	15	364	41,90702
	P660	11	15	364	41,90702
28	P661	12	1	364	41,82091
	P664	12	5	364	41,78986
29	P665	12	5	364	41,78986
	P666	12	5	364	41,78986
	P670	13	16	364	41,79487
30	P672	13	16	364	41,79487
	P671	13	1	364	41,82091
32	P674	14	17	364	41,86887
	P675	14	17	364	41,86887
	P677	14	17	364	41,86887
33	P678	14	17	364	41,86887
	P851	14	18	364	41,802

Como se observa en la **Tabla 11**, las variantes alélicas de GlpQ se correlacionan con el grupo clonal al que pertenecen. Así, todas las cepas de un mismo grupo clonal tienen el mismo alelo de *glpQ* (ejemplo: el grupo clonal 6 está integrado por las cepas P594, P595, P596 y P650, aisladas de 2 pacientes distintos, y todas presentan el alelo 5). Además, en algunos casos, cepas de distintos grupos clonales tienen el mismo alelo de *glpQ* (ejemplo: el alelo 1 está presente en todas las cepas de los grupos clonales 1, 8, 9, 14, 16, 17, 18, 20, 21, 28 y 31).

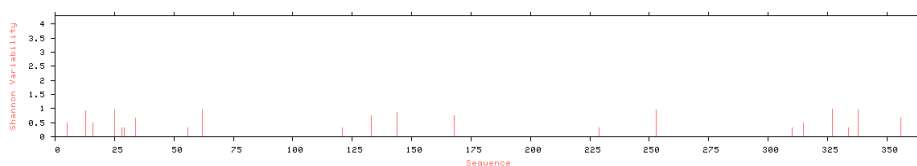


Figura 23. Variabilidad de la proteína GlpQ en HiNT. Representación gráfica de la variabilidad de GlpQ utilizando un alineamiento múltiple de todas las secuencias proteicas de las cepas de la colección clínica EPOC. El gráfico se ha realizado con la herramienta bioinformática *online imed.med.ucm.es/PVS/* (García-Boronat *et al.* 2008).

Todos los alelos de GlpQ presentan la secuencia correspondiente al péptido señal conservada. Este fragmento se corresponde con los primeros 17 aminoácidos del extremo N-terminal, y tiene la secuencia NH₂-MKLKT/PLALSLAA/TGVL/V-COOH. La proteína GlpQ_{HiNT375} presenta un 66 % de identidad con su homóloga en *E. coli* y, gracias al elevado grado de similitud (superior al 80%), se puede predecir un sitio de unión a cationes divalentes (Ca²⁺ o Mg²⁺ según las estructuras cristalográficas de *E. coli* depositadas en el *Protein Data Bank*, 1YDY y 1T8Q, respectivamente) en el que participan las cadenas laterales de 3 aminoácidos conservados en todos los alelos: E67, D69 y E175 (**Figura C1**, Anexo IV).

En general, la variabilidad de esta fosfodiesterasa en el conjunto de cepas estudiadas es baja, por lo que se trata de una proteína con un alto grado de conservación (**Figura 23**). Evidencias previas apuntan a una posible acción moduladora de la respuesta inflamatoria del huésped mediante la hidrolización de PAF por GlpQ. Su conservación, junto con la atenuación *in vivo* de la virulencia de una cepa $\Delta glpQ$, hace que la fosfodiesterasa GlpQ de HiNT sea una proteína candidata a ser explotada como diana terapéutica frente a la infección respiratoria por HiNT. Dicha explotación consistiría en la inhibición específica de su actividad enzimática, logrando así la atenuación del patógeno y la estimulación de la respuesta inflamatoria frente a la infección de forma simultánea.

3.6. Producción de la proteína de GlpQ_{HiNT375}

Se optimizó un ensayo de purificación de GlpQ de HiNT375 para obtener la proteína en cantidad y grado de pureza adecuados y, mediante un ensayo de actividad, realizar posteriormente un escrutinio de inhibidores de su actividad fosfodiesterasa. En este trabajo, se ha realizado la expresión, purificación y caracterización biofísica de GlpQ. El alelo GlpQ de HiNT375 fue escogido por pertenecer a la cepa que mostró fenotipo atenuado en infección pulmonar en modelo murino con su mutante isogénico $\Delta glpQ$ (**Apartado 3.4**).

3.6.1. Generación de un plásmido para la expresión de la proteína recombinante GlpQ_{HiNT375}

Se construyó la cepa *E. coli* BL21-pT7.7/*glpQ*_{NTHI375}, que mediante inducción con IPTG, expresa la proteína GlpQ_{NTHI375}. La estrategia de clonaje utilizada se detalla en la **Figura 24**.

Para ello, un fragmento de ADN correspondiente a los nucleótidos 58-1.095 del gen *glpQ* se obtuvo mediante PCR utilizando como molde ADN genómico de la cepa HiNT375 y cebadores que introdujeron los sitios de restricción *NdeI* en el cebador directo (*glpQ*_NdeI_F), y *BamHI* en el cebador reverso (*glpQ*_BamHI_R). Cabe destacar que, los nucleótidos 1-57, que codifican los 19 aminoácidos del extremo N-terminal (péptido señal de GlpQ), no se amplificaron ya que se ha descrito que la delección de estos aumenta la solubilidad y facilita la obtención de la proteína (Su *et al.* 2015). Se utilizó el vector de expresión pT7.7 que fue doblemente digerido con *NdeI* y *BamHI*. Como inserto, se empleó el fragmento que contiene el gen *glpQ*_{HiNT375} truncado, previamente amplificado y digerido con *NdeI* y *BamHI*. Vector e inserto se ligaron con ADN T4 ligasa. La reacción de ligación fue transformada en *E. coli* BL21 (DE3) y se seleccionaron colonias en LB agar+Amp₁₀₀. Mediante extracción de ADN plásmidico y PCR, se identificaron clones portadores del plásmido pT7.7-*glpQ*_{NTHI375}, obteniendo la cepa *E. coli* TOP 10 pT7.7-*glpQ*_{NTHI375}. El material plásmidico de *E. coli* TOP 10 pT7.7-*glpQ*_{NTHI375} fue extraído y transformado en bacterias *E. coli* BL21 electrocompetentes, obteniendo la cepa *E. coli* BL21-pT7.7/*glpQ*_{NTHI375}.

Se comprobó que la secuencia de *glpQ*_{NTHI375} clonada en *E. coli* BL21-pT7.7/*glpQ*_{NTHI375} fue correcta, mediante secuenciación del ADN plásmidico:

```
5' ATGAGCAGCCATTCATCAAGCATGGCAAATACCCAAATGAAATCTGACAAAATCATCATTGCTCACCGTGGTGCTAGCG
GTTATTTACCAGAGCATACTGTTAGAATCTAAAGCACTTGGCTTTGCACAGCAGCCTGATTACTTAGAGCAAGATTTAGCAA
TGACTAAAGATGGTCGTTTAGTGGTTATTACGATCACTTTTAGATGGCTTGACTGATGTTGCGAAAAAATTTCCACATC
GTCACCGTAAAGATGGTCGTTACTATGTTATCGACTTTACCTTAAAGAAATTCAAAGTTTAGAAATGACAGAAAACCTTG
AAACCAAAGATGGCAAACAAGCACAAGTTTATCCTAATCGTTTCCCCCTTTGGCAATCCCAATTTCCGTATTACACCTTTG
AAGATGAAATGAAATTTATCAAGGTTTAGAAAAATCGACGGGCAAAAAGTAGGGATTTATCCAGAAATCAAAGCACCTT
GGTCCACCATCAAATGGTAAAGATATTGCTGCTGAAACGCTCAAAGTGTAAAAAATATGGCTATGATAAGAAAACCG
ATATGGTTTACTTACAACCTTTTCGATTTTAAATGAATTAAAACGTATCAAACCGGAATTAATCCACAAATGGGAATGGATT
TGAATTAGTTCAATTAATTGCTTATACAGATTGGAAAGAAACACAAGAAAAGACCCAAAGGGTTATTGGGTAAACTATA
ATTACGATTGGATGTTAAACCTGGTGCAATGGCAGAAGTGGTAAATATGCCGATGGTGTGGCCAGGTTGGTATATGT
TAGTTAATAAAGAAGAATCCAAACCTGATAATATTGTGACACTCCGTTGGTAAAAAGAACTGCACAATATAATGTGGAAAG
TGCACTCCTTACACCGTGGCTAAAGATGCACCTACCTGCGTTTTTCACAGACGTAAATCAAATGTATGATGCCTTATTGAATA
AATCAGGGGCAACAGGTGATTTACTGATTTCCAGATACTGGCGTGGAATTCCTAAAAGGAATAAAAATAA 3'
```

La secuencia aminoacídica de la proteína $GlpQ_{HiNT375}$ expresada por *E. coli* BL21-pT7.7/ $glpQ_{NTHi375}$ se detalla en el **Anexo IV**.

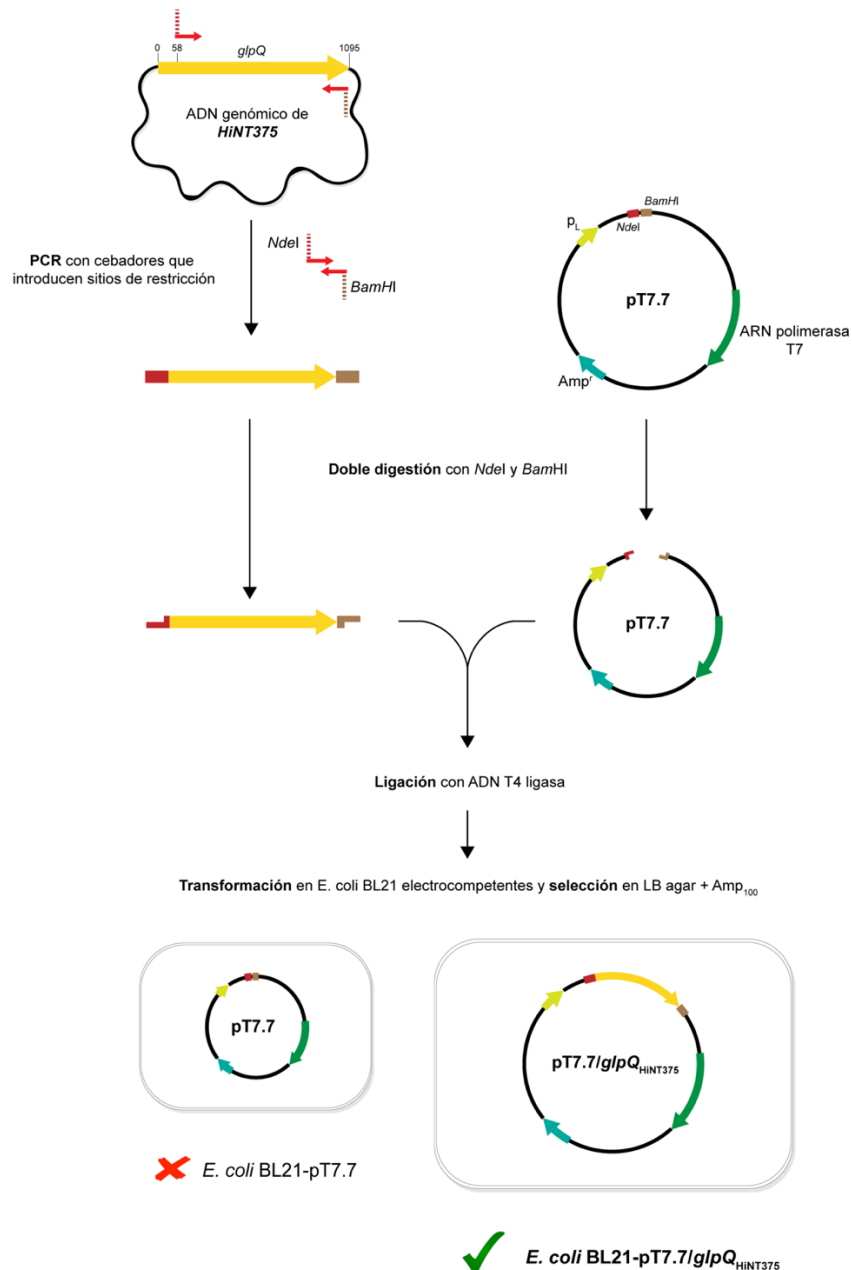


Figura 24. Estrategia de clonaje empleada para generar la cepa *E. coli* BL21-pT7.7/ $glpQ_{NTHi375}$.

3.6.2. Establecimiento de condiciones óptimas para la expresión y solubilidad de $GlpQ_{HiNT375}$

El plásmido pT7.7/ $glpQ_{NTHi375}$ fue purificado y transformado en *E. coli* BL21, dando lugar a la cepa *E. coli* BL21-pT7.7/ $glpQ_{NTHi375}$ (**Apartado 3.6.1**). La expresión del gen $glpQ_{HiNT375}$ está bajo el control del promotor p_T del fago lambda, inducible por IPTG.

Para la optimizar la expresión de $GlpQ_{HiNT375}$, se prepararon 4 cultivos de *E. coli* BL21-pT7.7/ $glpQ_{NTHi375}$ en 100 ml de LB + Amp₁₀₀ y se crecieron a $DO_{600} = 0,9$. En este punto, se testaron 4 condiciones de sobreexpresión de $GlpQ_{HiNT375}$ distintas: (i) IPTG 50 μ M durante 3 h a 37°C, (ii) IPTG 100 μ M durante 3 h a 37°C, (iii) IPTG 1 mM durante 3 h a 37°C, (iv) IPTG 1 mM durante 9

h a 37°C. Antes y después de la inducción, se recogieron alícuotas de cada matraz y se separaron electroforéticamente en un gel SDS-PAGE. Se observó una banda de aproximadamente 40 kDa (**Figura 25A**), que se corresponde al peso molecular predicho para GlpQ_{HINT375}(Δ1-19 aa), 40,02064 kDa. Para la predicción del peso molecular teórico GlpQ_{HINT375}, se utilizó la herramienta bioinformática *online* de ExPASy (web.expasy.org/compute_pi). La mejor condición de inducción fue IPTG 1 mM durante 3 h (carril 7). No se observó una banda intensa en la zona de ~40 kDa al analizar las muestras de cultivos no inducidos. Por tanto, el sistema de inducción utilizado es robusto y la expresión de GlpQ_{HINT375} no presenta escapes.

A continuación, el cultivo inducido con IPTG 1 mM durante 3 h fue recogido y sonicado. De este modo, se rompió la membrana plasmática de las bacterias, liberando al medio el contenido celular, donde se encuentra GlpQ_{HINT375}. Tras centrifugar el lisado bacteriano, *pellet* y sobrenadante fueron separados y analizados mediante SDS-PAGE. La mayor proporción de GlpQ_{HINT375} fue detectada en la fracción correspondiente al sobrenadante (**Figura 25B**), indicando que la proteína expresada es soluble y sugiriendo una compatibilidad adecuada con el huésped recombinante empleado.

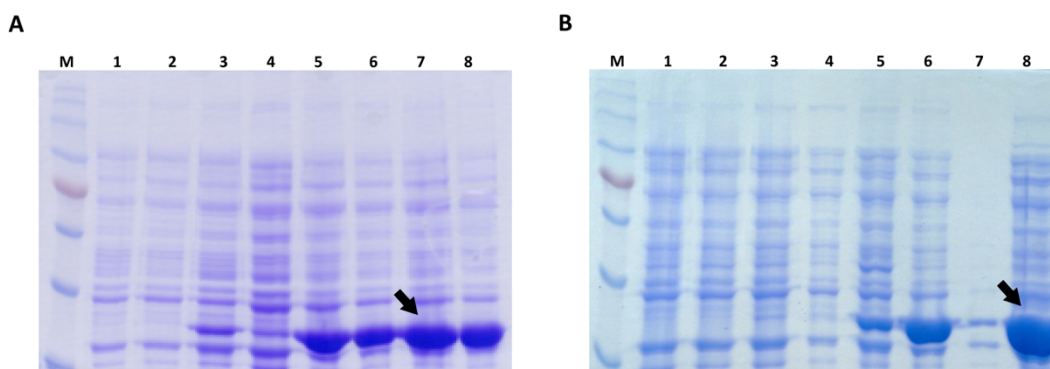


Figura 25. Expresión de GlpQ_{HINT375} a pequeña escala. (A) Sobreexpresión de GlpQ_{HINT375} a distintos tiempos y concentraciones de IPTG. Carril M: marcador de peso molecular; carril 1: *E. coli* BL21, 10 h; carril 2: *E. coli* BL21 + pT7.7[vacío], 10 h; carril 3: *E. coli* BL21 + pT7.7[glpQ_{HINT375}], 10 h; carril 4: *E. coli* BL21 + pT7.7[glpQ_{HINT375}] – IPTG, 3h; carril 5: *E. coli* BL21 + pT7.7[glpQ_{HINT375}] + IPTG 50μM, 3h; carril 6: *E. coli* BL21 + pT7.7[glpQ_{HINT375}] + IPTG 100μM, 3h; carril 7: *E. coli* BL21 + pT7.7[glpQ_{HINT375}] + IPTG 1mM, 3h (condición elegida como óptima, resaltada con una flecha); carril 8: *E. coli* BL21 + pT7.7[glpQ_{HINT375}] + IPTG 1mM, 10 h. **(B)** Prueba de solubilidad de GlpQ_{HINT375}. Carriles M, 1-4: igual que (A); carril 5: *E. coli* BL21 + pT7.7[glpQ_{HINT375}] + IPTG 1mM, 3h; carril 6: extracto proteico generado mediante el lisado del cultivo bacteriano tras la inducción; carril 7: fracción del *pellet* tras centrifugar el extracto bacteriano lisado; carril 8: fracción del sobrenadante tras centrifugar el extracto bacteriano lisado (fracción mayoritaria de GlpQ_{HINT375}, resaltada con una flecha).

3.6.3. Purificación de GlpQ_{HINT375} a gran escala

Una vez determinadas las condiciones óptimas del proceso, se utilizó 1 l de cultivo de la cepa *E. coli* BL21-pT7.7/*glpQ_{HINT375}* para expresar y posteriormente purificar la proteína GlpQ_{HINT375} (**Apartado 18**, Materiales y Métodos).

Tras lisar el resuspendido bacteriano, se realizó una precipitación fraccionada con SA, en la que precipitan contaminantes a concentraciones de 33%, 40% y 45% de SA, mientras que la mayor parte de GlpQ_{HINT375} permanece en la fracción soluble de la muestra con 45% SA (**Figura 26B**). A continuación, tras ser dializada para eliminar el SA, se realizó en una cromatografía de intercambio aniónico de la que se tomaron muestras para monitorizar mediante electroforesis SDS-PAGE (**Figura 26A**). No obstante, ninguna de las fracciones eluidas progresivamente en el gradiente de fuerza iónica contiene a GlpQ_{HINT375} (**Figura 26C**). Al contrario de lo esperado para una proteína con un punto isoeléctrico teórico de 6.24, a pH 8, condición en la que se hizo la cromatografía, GlpQ_{HINT375} debería tener una carga neta positiva y quedar retenida en la columna. Sin embargo, no lo hizo, se eluyó con un alto grado de pureza tras cargar la columna (carril 1, **Figura 26C**). Tras comprobar espectrofotométricamente un alto contenido de ADN en

la muestra, este fue eliminado en un proceso de concentración y dilución iterativo hasta disminuir la intensidad de la banda de absorción de este (DO_{260}) a la mitad de la intensidad de la banda característica de las proteínas (DO_{280}). Finalmente, se obtuvieron 2 fracciones de 10 ml con concentraciones de 3,7 y 3,3 mg/ml con una pureza en torno al 98 % (**Figura 26D**). El rendimiento aproximado de producción de GlpQ_{HINT375} fue de 70 mg proteína/l cultivo. Para estimar la concentración de la proteína, se utilizaron valores de DO_{280} y el coeficiente de extinción molar ($\epsilon=61310 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Este es un valor teórico predicho a partir de la secuencia mediante la herramienta bioinformática online de ExpASY (web.expasy.org/protparam).

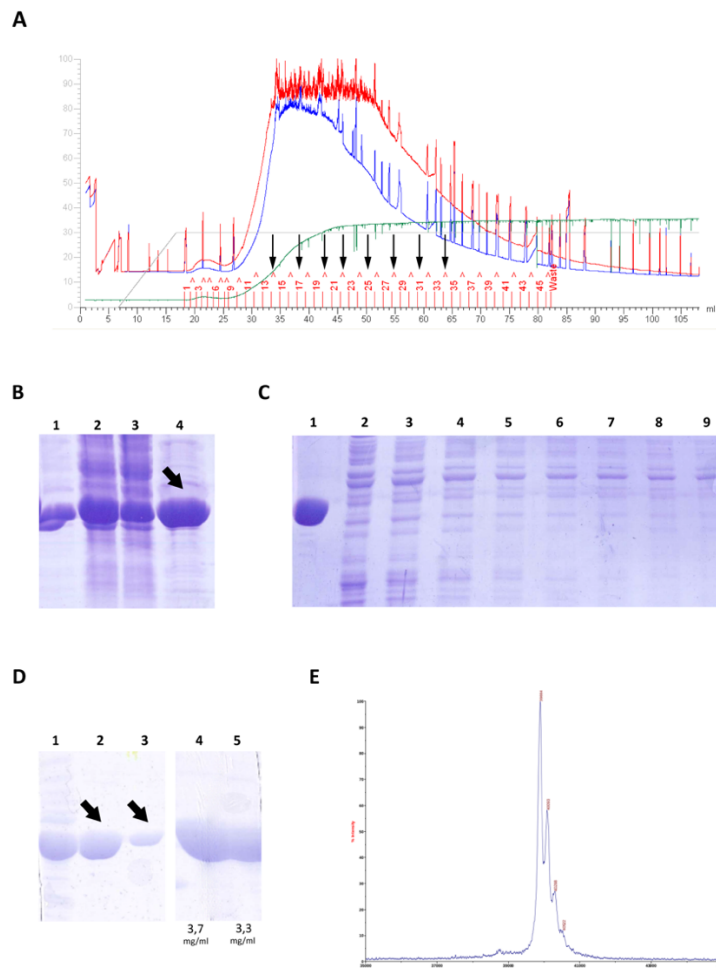


Figura 26. Sistema de expresión de GlpQ_{HINT375} a gran escala. (A) Esquema del proceso de elución en cromatografía de intercambio aniónico. Línea roja: DO_{260} , absorbancia ADN; línea azul: DO_{280} , absorbancia proteínas; línea gris: concentración NaCl; línea verde: conductividad. Se señalan con flechas las fracciones del eluido que fueron analizadas mediante SDS-PAGE. (B) Análisis SDS-PAGE de muestras recogidas durante el proceso de precipitación fraccionada con SA. Carril 1: *pellet* 33% SA; carril 2: *pellet* 40% SA; carril 3: *pellet* 45% SA; carril 4: sobrenadante 45% SA (fracción mayoritaria de GlpQ_{HINT375}, resaltada con una flecha). (C) Análisis SDS-PAGE de las fracciones del eluido de la columna de cromatografía susceptibles de contener GlpQ. Carril 1: fracción eluida tras cargar la columna; carriles 2-9: fracciones de eluido durante el gradiente discontinuo 0 – 0,3 M NaCl. Se observa GlpQ_{HINT375} en la muestra sembrada en la columna DEAE-celulosa pero no en ninguna fracción del eluido. (D) Presencia de GlpQ_{HINT375} en el extracto bacteriano inicial (carril 1). El eluido inicial del proceso de siembra, correspondiente a las proteínas que no han interactuado con la columna de intercambio aniónico se recogió en dos fracciones (carriles 2 y 3) que contienen GlpQ_{HINT375} con un grado de pureza elevado. El ADN y otros contaminantes de bajo peso molecular fueron eliminados, obteniendo dos fracciones más puras y concentradas (carriles 4 y 5). (E) El análisis de la proteína purificada mediante espectrometría de masas confirmó la identidad de GlpQ_{HINT375}, y determinó su peso molecular. El pico principal se corresponde a GlpQ_{HINT375}, mientras que los adyacentes pertenecen a la proteína interactuando con, de izquierda a derecha; sodio, potasio, y la propia matriz del equipo.

La proteína purificada fue analizada mediante espectrometría de masas para confirmar su identidad mediante la determinación de su masa con precisión. En el espectro obtenido, se identificó un pico principal correspondiente a GlpQ_{HINT375}, con un peso molecular experimental de 39,889 kDa, que es exactamente la masa teórica de la proteína sin la metionina inicial. Este

residuo es habitual que sea procesado y se pierda en sistemas de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* ((Liao *et al.* 2004)). El elevado grado de pureza también se deduce aquí por la ausencia de otros picos pertenecientes a contaminantes en el espectro (**Figura 26E**).

3.6.4. Caracterización biofísica de GlpQ_{HiNT375}

Tras producir GlpQ_{HiNT375} con un alto rendimiento y elevado grado de pureza, se llevó a cabo una caracterización de algunas propiedades biofísicas de la proteína, utilizando las técnicas descritas en el **Apartado 19** (Materiales y Métodos).

La espectroscopía de dicroísmo circular (DC) es una de las técnicas más empleadas en el estudio de las propiedades conformacionales de proteínas en disolución. Generalmente se obtienen espectros en las regiones del ultravioleta lejano (260-200 nm) (**Figura 27A**) y cercano (340-250 nm) (**Figura 27B**) de la radiación electromagnética. En la región del UV-cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptófano, tirosina, y fenilalanina. Ya que la asimetría de estos grupos químicos se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos generalmente se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación global de la proteína. Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente a los enlaces amida que unen los residuos de los aminoácidos entre sí. La asimetría de estos cromóforos se debe a la distribución espacial de la cadena principal de la proteína (ángulos diedros ϕ y ψ), por lo tanto, las señales de dicroísmo circular se pueden interpretar en términos del contenido de estructura secundaria presente, es decir, se pueden relacionar con el porcentaje de residuos que se encuentran en las diferentes conformaciones estructurales: hélices α , láminas β , giros β o estructuras desordenadas. Dada la posibilidad de que GlpQ_{HiNT375} pueda unir a cationes divalentes como lo hace su homóloga de *E. coli* (Larson & van Loo-Bhattacharya 1988), se recogieron espectros en presencia de cationes de calcio así como en ausencia de estos. La unión de estos cationes a proteínas puede modificar la intensidad y posición de sus bandas características. En ausencia de cationes el espectro de GlpQ_{HiNT375} muestra dos mínimos relativos en la región de 210 nm y 220 nm en el UV-lejano, y su espectro es característico de proteínas con elevado contenido de α -hélices en su estructura secundaria (**Figura 27A**). La adición de 1 mM Ca²⁺ no modifica el espectro a 20 °C. Al registrar los espectros a una temperatura elevada (80 °C) se observa que el espectro en ausencia de cationes pierde intensidad debido a la desnaturalización térmica parcial de la muestra, pero las bandas se conservan, siendo la de 210 nm la que más se modifica. Sin embargo, en presencia de ambos cationes las bandas desaparecen y la intensidad es cero lo que se debe a la precipitación de la muestra. Seguidamente, las muestras se volvieron a enfriar, recuperando parcialmente la señal inicial en condiciones de ausencia de Ca²⁺, pero no en presencia de Ca²⁺.

En el UV-cercano, el espectro muestra un máximo muy ancho a 265-270 nm y un mínimo a 290 nm, y en presencia de cationes divalentes tampoco se modifica (**Figura 27B**). Estas dos bandas son características de los anillos aromáticos empaquetados y enterrados e indican que GlpQ_{HiNT375} está plegada y no se produce un cambio importante en la estructura terciaria por la presencia de los cationes.

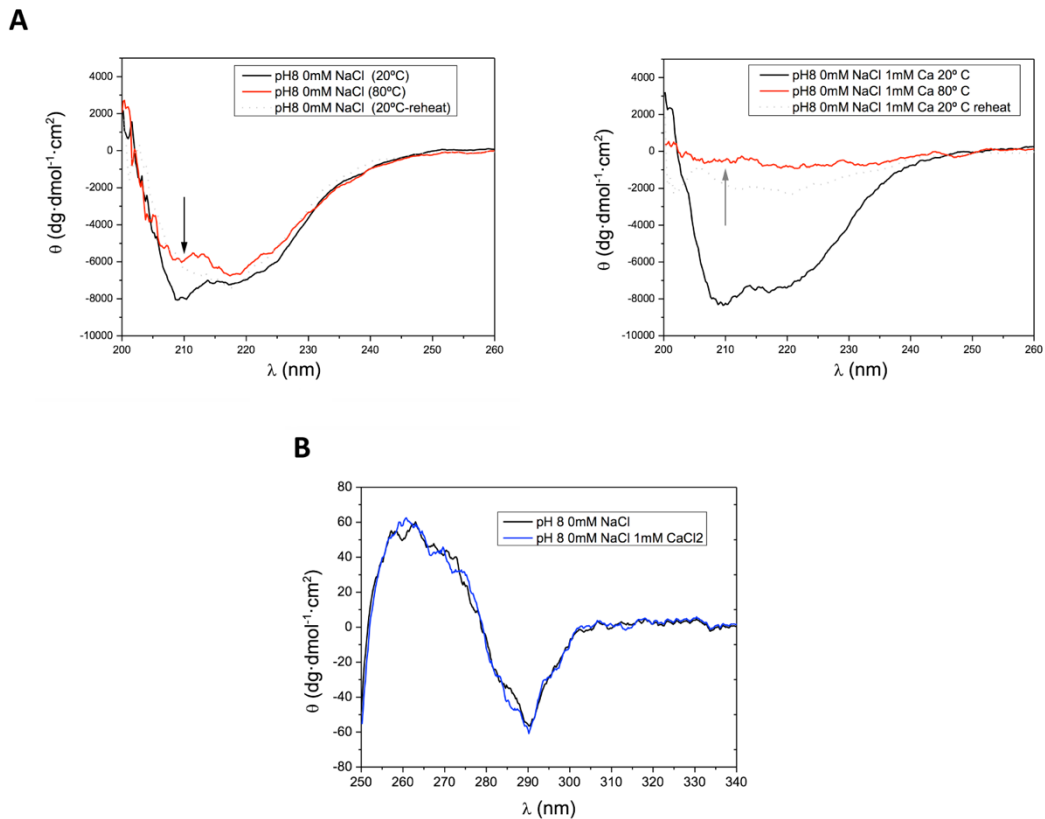


Figura 27. Espectros de dicroísmo circular de GlpQ_{HiNT375}. (A) Espectros DC en el UV-lejano; izq: sin NaCl ni Ca²⁺, dcha: sin NaCl y con Ca²⁺. La línea negra se refiere a la proteína a T^a ambiente y la roja a 80°C donde, en presencia de calcio, GlpQ_{HiNT375} precipita y se pierde la señal. La línea punteada se corresponde con la muestra a 80°C reenfrizada de nuevo a T^a ambiente. (B) Espectros DC en el UV-cercano de GlpQ_{HiNT375} en dos condiciones distintas; sin NaCl ni Ca²⁺ (línea negra) y sin NaCl y con Ca²⁺ (línea azul).

El efecto de la unión de los cationes en la estabilidad de GlpQ_{HiNT375} se estudió monitorizando, en ausencia y en presencia de iones divalentes, las variaciones inducidas por el aumento de la temperatura en todo el espectro, y siguiendo la elipticidad a 210 nm (θ_{210}) (Figura 27). En primer lugar, se observó que la proteína en presencia de 1mM de Ca²⁺ precipita formando agregados irreversibles y su señal se pierde al superar los ~45 °C, como se puede observar en la colección de espectros a distintas temperaturas (Figura 27A) o en la curva de desnaturalización térmica cuya señal hace una transición brusca a valores próximos a cero (círculos blancos, Figura 27B). La curva de desnaturalización en ausencia de cationes (círculos negros) presenta una transición más suave, de menor amplitud y aparentemente con una estabilidad menor (su punto medio es 4 °C más bajo), lo que indicaría que la unión de los cationes divalentes aumentaría la estabilidad GlpQ_{HiNT375}, independientemente de la ausencia/presencia de sal. Dado que en esta segunda curva se estarían acoplado los dos procesos (el de estabilización por la unión de los metales divalentes y la precipitación de la muestra) es difícil comparar con la curva en ausencia de cationes porque esta no refleja la precipitación. Con la intención de comprobar la estabilización por la unión, se registraron otras dos curvas en presencia y ausencia de los cationes (triángulos blancos y negros, respectivamente), pero en este caso a una mayor fuerza iónica (200 mM NaCl) que también induce la precipitación de la muestra con la temperatura independientemente de los cationes divalentes. La presencia de sal en ausencia de iones divalentes constituye una condición desfavorable para la estabilidad de la proteína. La sal puede estar apantallando las cargas de la proteína, provocando que desaparezcan posibles fuerzas electroestáticas de repulsión entre las moléculas. De este modo, la neutralización de las cargas de GlpQ_{HiNT375} favorece que agregue y precipite. La curva con ambos cationes es idéntica a la observada anterior a baja fuerza iónica

mientras que la muestra con cationes y 200mM NaCl presenta una transición de forma similar pero desplazada a aproximadamente 4 °C menos (**Figura 27B**).

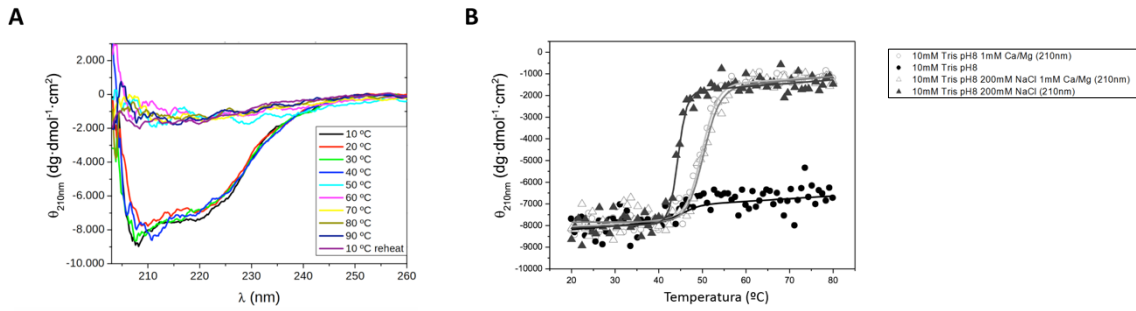


Figura 28. Análisis de la dinámica de desnaturalización térmica de GlpQ_{HINT375} y la formación de precipitados. (A) Superposición de espectros de DC en UV-lejano a distintas T^º, cada uno de ellos representado con un color distinto. **(B)** Variación de la θ₂₁₀ de GlpQ_{HINT375} en distintas condiciones de presencia/ausencia de NaCl e iones divalentes.

La estructura cuaternaria de GlpQ_{HINT375} se caracterizó mediante ensayos de ultracentrifugación (**Figura 28**). El análisis de los perfiles de sedimentación a diferentes condiciones de fuerza iónica muestra dos picos cuyos coeficiente de sedimentación ($s_{20,w} = 3,3$ S y $s_{20,w} = 4,9$ S) son compatibles con dos especies de masa molecular aparente de 40,0 kDa y de 80,0 kDa, lo que nos sugiere la coexistencia en disolución de monómero y un dímero de GlpQ_{HINT375} en una proporción aproximada del 50%. Se intuye un efecto tenue de la sal hacia el aumento del dímero, que puede estar relacionado con que, al aumentar la concentración salina, la viscosidad del tampón aumenta y la proteína se desplaza más lentamente. En presencia de Ca²⁺ y Mg²⁺, la distribución de coeficientes de sedimentación cambia y muestra mayoritariamente (85%) el pico de 4,9 S, correspondiente al dímero. Cuando se determina la

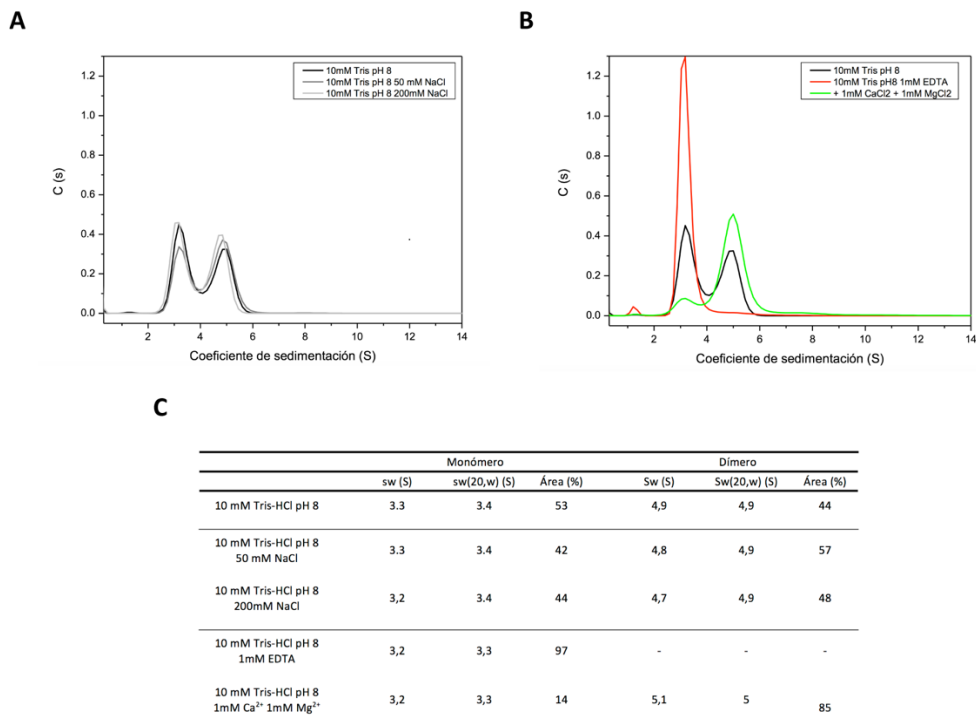


Figura 29. Ensayos de ultracentrifugación con la proteína GlpQ_{HINT375}. **(A)** La proteína está presente en forma de monómero y dímero en tampón 10 mM Tris-HCl pH 8 en presencia o ausencia de NaCl. **(B)** La presencia de iones divalentes provoca que el equilibrio se desplace hacia la forma dimérica. **(C)** Valores de sedimentación correspondientes a ambas formas monómero/dímero en las distintas condiciones de concentración de sal e iones divalentes testadas.

velocidad de sedimentación en presencia de EDTA, un agente quelante que secuestra los iones divalentes que pueda contener el tampón o haya arrastrado la propia proteína en el proceso de purificación, se observa un efecto contrario en la distribución, es decir, sólo se aprecia un pico (97% del área) de 3,2 S correspondiente al monómero (**Figura 29**). Los cationes divalentes estarían estabilizando a GlpQ_{HiNT375} y favoreciendo su dimerización. Además, los patrones de DC en el UV-lejano y el UV-cercano son los mismos tanto en ausencia como en presencia de Ca²⁺, sugiriendo que las dos formas de la proteína, monómero (en ausencia de calcio) y dímero (en presencia de calcio), presentan la misma estructura secundaria y terciaria.



DISCUSIÓN

1. *H. influenzae* REGULA DIFERENCIALMENTE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON SU METABOLISMO CENTRAL SEGÚN LA DISPONIBILIDAD DE O₂

Estudios previos han caracterizado la microbiota humana del tracto respiratorio, así como las condiciones cambiantes en la concentración de O₂. En enfermedades respiratorias crónicas como la EPOC, el daño tisular provocado por la infección persistente y por el avance de la enfermedad se traduce en una menor disponibilidad de O₂ a la que bacterias como HiNT deben de adaptarse metabólicamente para establecer una infección persistente (Huffnagle *et al.* 2017).

Diversos análisis genómicos comparativos han permitido conocer el metabolismo de *H. influenzae* (Tatusov *et al.* 1996, Raghunathan *et al.* 2004, Edwards & Palsson 1999). Se ha descrito que *H. influenzae* RdKW20 utiliza un metabolismo fermentativo asistido por fermentación, ya que presenta las rutas de la glucólisis y las pentosas fosfato completas, y un ciclo de Krebs incompleto con un amplio arsenal de dehidrogenasas y reductasas encargadas de hacer frente al poder oxidativo generado por el catabolismo de azúcares. Si bien el metabolismo de *H. influenzae* es conocido, pocos estudios han examinado los mecanismos de adaptación metabólica de *H. influenzae* recientemente (Othman *et al.* 2014). En este estudio, se analiza el efecto de una baja disponibilidad de O₂ en el patrón de expresión de genes involucrados en el metabolismo central de la bacteria. La investigación de Othman *et al.* será utilizada para discutir los resultados obtenidos en este trabajo.

En nuestro estudio, los niveles de expresión génica de RdKW20 y HiNT411 en anaerobiosis fueron mayores que en aerobiosis, especialmente en aquellos genes relacionados con la cadena de transporte electrónico. Estas evidencias coinciden con las recogidas para RdKW20 y Hi2019, un aislado clínico EPOC (Othman *et al.* 2014). En este trabajo previo, se analizó la expresión génica de las cepas de *H. influenzae* RdKW20 y HiNT2009, crecidas en CDM con distintas concentraciones de O₂. De ese estudio se obtienen evidencias de que el principal producto de *H. influenzae* en aerobiosis es el acetato, y en anaerobiosis el formato. Nuestro grupo de investigación estableció una colaboración con los investigadores de este estudio, determinando la concentración de metabolitos generados por HiNT411 al crecer en aerobiosis, o en anaerobiosis. HiNT411 acumula acetato en aerobiosis, mientras que en anaerobiosis el principal producto metabólico generado es el succinato, y no formato. Esto indica que en anaerobiosis, RdKW20 y HiNT411 regulan su metabolismo de distinta manera. La vía alternativa que sigue HiNT411 acumulando succinato en lugar de formato en condiciones de baja disponibilidad de O₂ no había sido observada previamente en *H. influenzae*. Es importante tener en cuenta que la determinación de metabolitos se realizó con bacterias crecidas en CDM mientras que nuestro estudio de expresión génica ha sido realizado con bacterias crecidas en sBHI. Comparando los datos de expresión obtenidos con RdKW20 crecida en sBHI en este estudio con los de la misma cepa crecida en CDM (Othman *et al.* 2014), se observan patrones de expresión comparables para ambas condiciones de disponibilidad de oxígeno, si bien no idénticos.

RdKW20 ve aumentada la expresión de *pflA* al crecer en anaerobiosis y sBHI, acumulando formato durante su crecimiento en CDM. No obstante, en HiNT411, aunque al disminuir la disponibilidad de O₂ también aumenta la expresión de *pflA* de forma similar a RdKW20, en esta cepa se acumula succinato. Esta acumulación puede ser explicada por el aumento en la expresión de *frdA*, gen que codifica la enzima encargada de la conversión de fumarato en succinato. Sin embargo, RdKW20 también ve aumentada la expresión de *frdA* al disminuir la concentración de O₂, y el succinato no es el principal producto de su metabolismo. Por tanto, deben existir otros determinantes cepa-dependientes distintos a la expresión de estos genes que influyen en este desbalance adaptativo de *H. influenzae*. Otros autores, sin embargo, no reportaron variaciones elevadas en la producción de formato durante el crecimiento en sBHI en anaerobiosis (Raghunathan *et al.* 2004).

En este trabajo, se analiza por primera vez el desbalance metabólico de *H. influenzae* modulado mediante disrupción de los genes que codifican enzimas esenciales para el metabolismo bacteriano: AckA, PflA y FrdA. Los patrones de expresión génica de las cepas mutantes son distintos a los de las respectivas cepas silvestres.

A partir de los resultados obtenidos, especulamos que la disrupción de cada gen puede llevar a *H. influenzae* hacia la acumulación de determinados metabolitos en cada una de las condiciones de disponibilidad de O₂. La mutación $\Delta pflA$ dirige el metabolismo de *H. influenzae* hacia la producción de acetato y succinato en aerobiosis, y acetato en anaerobiosis. La disrupción del gen *ackA* parece ser la más desfavorable para la bacteria desde el punto de vista energético ya que, tanto en aerobiosis como en anaerobiosis aumenta la expresión del gen *aceF*, lo que supondría la acumulación de cantidades elevadas de acetil-fosfato que no pueden ser completamente oxidadas para obtener energía, debido a la disrupción del gen *ackA*. AckA debe ser una enzima clave en el metabolismo de *H. influenzae*, y estas últimas observaciones explican, al menos parcialmente, que en los dos fondos genéticos analizados el mutante $\Delta ackA$ presente un crecimiento muy limitado en sBHI respecto la cepa silvestre y el resto de mutantes. Además, las observaciones apuntan a que en aerobiosis se acumularía formato, mientras que en anaerobiosis no. Por otro lado, el fenotipo de los mutantes $\Delta frdA$ es heterogéneo entre fondos genéticos y condiciones de crecimiento. En condiciones de elevada disponibilidad de oxígeno un aumento en la expresión de *ackA* y *pflA* sugieren la acumulación de acetato y formato, respectivamente. Al disminuir la concentración de O₂, los cambios de expresión génica pueden ir dirigidos a la producción de lactato. Ensayos adicionales de determinación de metabolitos serán necesarios para dotar a estos resultados e hipótesis de la significación biológica necesaria.

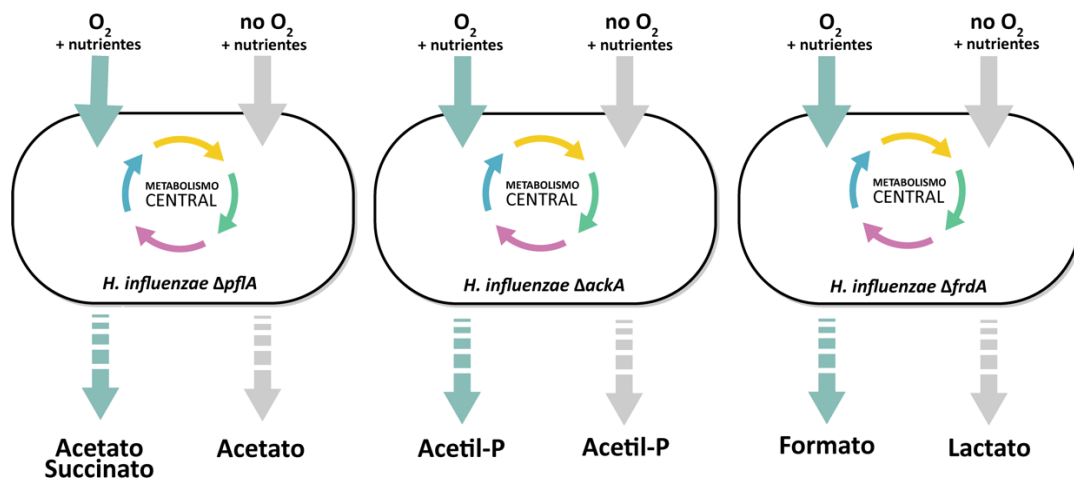


Figura 30. Posibles productos metabólicos acumulados durante el crecimiento de *H. influenzae* en sBHI en distintas condiciones de disponibilidad de O₂, al mutar los genes que codifican los enzimas PflA, AckA, y FrdA, respectivamente.

En conjunto, las observaciones recogidas en este estudio apoyan observaciones anteriores sobre la plasticidad del metabolismo de *H. influenzae* y la existencia de mecanismos de adaptación de naturaleza metabólica. Además, este trabajo aporta evidencias experimentales que contribuyen a entender cómo sucede esta adaptación y las estrategias empleadas por *H. influenzae* en cada situación.

2. LA EXPRESIÓN REGULADA POR VARIACIÓN DE FASE DE Hmw1A SE RELACIONA CON EL FENOTIPO HIPERINVASOR DE HiNT

Trabajos previos afirman que las cepas de HiNT aisladas de esputos de pacientes con exacerbación EPOC son mayoritariamente de nueva adquisición (Sethi 2004, Chin *et al.* 2005, Sethi *et al.* 2002). De este modo, las exacerbaciones estarían producidas por cepas de nueva entrada, que no son reconocidas por los anticuerpos generados previamente por cepas colonizadoras. Esta idea contrasta con observaciones posteriores, y con la naturaleza de la colección de aislados clínicos de HiNT utilizada en este estudio. Es una colección longitudinal prospectiva de 91 aislados crónicos que producen exacerbación EPOC. Por la forma en la que son aisladas las cepas desde las muestras de esputo, únicamente se reaisla la cepa que se encuentra en mayor proporción en ese momento de la infección, lo que constituye una debilidad a la hora de analizar la co-existencia de varias cepas de HiNT en cada exacerbación. El análisis genómico de los aislados clínicos HiNT en estudio ha revelado que cepas reaisladas del mismo paciente en momentos distintos de la enfermedad, pueden pertenecer al mismo aislado clonal. Así, tanto cepas colonizadoras crónicas como cepas de nueva entrada, pueden ser las causantes de los episodios de exacerbación de la EPOC. Igualmente, la colección de aislados EPOC en estudio soporta trabajos previos que demuestran la persistencia de algunas cepas de HiNT que son reaisladas a lo largo del tiempo (Murphy *et al.* 2004). Esta persistencia puede estar ligada a una respuesta inmune inefectiva por parte del huésped, así como al desarrollo de mecanismos de adaptación por parte de HiNT.

El fenotipo de autoagregación bacteriana en *H. influenzae* es ampliamente conocido (Mell *et al.* 2016). Sin embargo, su representatividad en la naturaleza infectiva de la EPOC no ha sido abordada. En este estudio, se analizó la capacidad autoagregativa de un conjunto de 91 aislados clínicos de HiNT. Una frecuencia de aparición significativa del fenotipo autoagregativo fue observada en las cepas que integran esta colección, autoagregando 70 cepas y presentando un fenotipo intermedio otras 13, constituyendo en conjunto el 91,2% del total. Este fenotipo, así como la formación de microcolonias, han sido previamente descritos y asociados a una proteína de superficie de HiNT; la adhesina Hap (Hendrixson & St Geme 1998, Fink *et al.* 2003). Hap ha sido caracterizada y se ha estudiado su papel durante el proceso infeccioso del epitelio respiratorio humano por HiNT (Euba *et al.* 2015b). Tras observar la alta representatividad de cepas autoagregativas en pacientes EPOC, en este trabajo se ha analizado por primera vez la relevancia de este fenotipo en la naturaleza, así como la implicación de Hap en el mismo. Se observó que 89 cepas presentan el gen *hap* completo, por lo que casi la totalidad de las cepas presentan un alelo funcional. No obstante, Hap es una proteína variable, y su variabilidad se concentra en la región de la proteína expuesta en la superficie bacteriana y que es potencialmente antigénica. Esta región, al estar expuesta a las células del huésped y a elementos solubles del sistema inmune, constituye una ventaja evolutiva ya que su variabilidad permite a HiNT poder ser reconocido por el huésped o evadir la respuesta inmune. En conjunto, este trabajo supone el análisis más exhaustivo de la variabilidad de la adhesina Hap en aislados clínicos realizado hasta la fecha.

En cuanto a la asociación Hap-fenotipo de autoagregación, no se pudo establecer una relación directa, ya que existen cepas que no autoagregan y sí presentan el gen *hap* completo. Las diferencias entre los alelos de Hap pueden traducirse en diferencias funcionales, a su vez relacionadas con las diferencias fenotípicas observadas. Además, el fenotipo de autoagregación puede no deberse únicamente a la funcionalidad de Hap, ya que cepas con el mismo alelo de *hap* tienen capacidades autoagregativas diferentes. Las cepas P589 y P590 tienen el mismo alelo de Hap truncado y potencialmente no funcional, ya que les falta parte del gen que codifica para el barril β , que es el que está encajado en la membrana externa, localizando adecuadamente la proteína. A pesar de tener el mismo alelo, P589 no autoagrega mientras que P590 sí lo hace, por

lo que, probablemente, existen otros determinantes genéticos asociados al fenotipo de autoagregación.

Por otra parte, se ha descrito previamente un fenotipo hiperinvasor de HiNT, relacionado con el de autoagregación y con la presencia de determinados alelos de HmwA (Mell *et al.* 2016). Del modo en el que se ha realizado el escrutinio, se encontraron en la colección en estudio 4 aislados que presentan fenotipo hiperinvasor; P651, P652, P653 y P654. Estas cepas, del mismo tipo clonal, son aislados EPOC, por lo que presentan un origen anatómico distinto al de la cepa hiperinvasora 86-028NP, que es un aislado de otitis media pediátrica. Además del fenotipo de hiperinvasión, se ha encontrado en estas cepas un rasgo de adaptación en base a la variación de fase de los operones *hmw1ABC* y *hmw2ABC*, asociado a la expresión y traducción de las invasinas Hmw1A y Hmw2A. Este mismo tipo de adaptación fue descrito previamente a nivel de genotipo, observando diferencias en el número de repeticiones de heptanucleótidos entre aislados (Dawid *et al.* 1999), y a nivel traduccional, detectando cantidades decrecientes de estas proteínas en aislados de HiNT persistentes (Cholon *et al.* 2008). En este trabajo, se asocia la variación de fase observada en la región promotora de *hmw1A* con cambios en su expresión génica y en la capacidad invasora de las cepas de este tipo clonal.

Si bien, el grupo de investigación observó recientemente que el alelo de Hmw1A presente en la cepa 86-028NP está involucrado en la capacidad invasiva de HiNT, no se conoce la representatividad de este mecanismo en el contexto de la EPOC (Mell *et al.* 2016). Las observaciones de este trabajo indican que las cantidades de Hmw2A se mantienen constantes en P651, P652, P653 y P654, mientras que Hmw1A disminuye su expresión y traducción entre aislados, debido a un aumento paulatino del número de repeticiones del heptanucleótido 5'ATCTTTC3' en el promotor del operón *hmw1ABC*. De este modo, las cepas P651 y P652 presentan altas cantidades de Hmw1A lo que les otorga una elevada capacidad de entrada en células epiteliales respiratorias humanas, y P653 y P654 expresan en menor medida esta proteína, disminuyendo la invasión pero, al mismo tiempo, facilitando la evasión del sistema inmune, respuesta adaptativa descrita previamente (Cholon *et al.* 2008). Con este trabajo, describimos un nuevo sentido biológico a este mecanismo de adaptación por variación de fase. Así, se amplía la asociación Hmw1A-fenotipo hiperinvasor; determinados alelos de *hmw1A*, así como sus niveles de expresión están, al menos parcialmente, relacionados con el fenotipo hiperinvasor.

Los ensayos de infección prolongada del epitelio respiratorio humano realizados con la cepa P652 mostraron un estadio intracelular en compartimentos subcelulares ácidos de tipo endosoma tardío, en los que la bacteria se encuentra en estado no replicativo y metabólicamente activa. Estos resultados son consistentes con trabajos previos del grupo de investigación, que describen este mismo tipo de dinámica intracelular en la cepa HiNT375 (Morey *et al.* 2011). P652 es un aislado de EPOC hiperinvasor, mientras que HiNT375 es un aislado de otitis media no hiperinvasor, por lo que las observaciones realizadas no se limitan a un único origen anatómico. La dinámica de vida intracelular de P652 y HiNT375 es similar, por lo que estudios posteriores serán necesarios para determinar la implicación del fenotipo hiperinvasor en la vida intracelular, y en la infección en general, por este patógeno.

3. LA FOSFODIESTERASA GlpQ ES UN FACTOR DE VIRULENCIA DE HiNT QUE PUEDE SER EXPLOTADO DESDE EL PUNTO DE VISTA TERAPÉUTICO

Para determinar el papel de GlpQ en la infección del epitelio respiratorio humano por HiNT, dos cepas de *H. influenzae* fueron empleadas, generando los mutantes RdKW20 Δ glpQ y HiNT375 Δ glpQ. Ambos mutantes presentaron una menor decoración de su superficie con PCho, lo que no tuvo implicaciones directas en la tasa de división ni en la capacidad autoagregativa de *H. influenzae*.

En un ensayo de susceptibilidad bacteriana a péptidos antimicrobianos, se observó una mayor resistencia a colistina de las cepas silvestres frente a sus respectivos mutantes Δ glpQ. De este modo, GlpQ, al proporcionar a HiNT de fuentes adicionales de PCho, se relaciona positivamente con la resistencia a elementos solubles de la respuesta inmune del hospedador, como son los péptidos antimicrobianos. Estas observaciones coinciden con otras previamente reportadas (Lysenko *et al.* 2000b).

Por otra parte, se ensayó el papel de GlpQ en la adhesión e invasión de células respiratorias epiteliales A549. No se observaron diferencias entre las cepas silvestres y los mutantes Δ glpQ, al contrario de lo descrito previamente en otros estudios. Ahrén *et al.* reportaron índices de invasión de HiNT772 mayores que los de la cepa HiNT772 Δ glpQ en células fagocíticas, sugiriendo una relación de GlpQ con la adhesión e invasión de HiNT772 a este tipo celular (Ahrén *et al.* 2001). Evidencias similares fueron observadas infectando células bronquiales (*Human Bronchial Epithelial Cells*, NHBE) y células A549, con las cepas 86-028NP y 86-028NP Δ glpQ (Johnson *et al.* 2011). Las diferencias entre nuestro trabajo y los dos anteriores pueden deberse al fondo genético de *H. influenzae* utilizado (HiNT375 frente a HiNT772/86-028NP) y/o en la metodología utilizada en los ensayos de infección, ya que en este estudio se utilizaron bacterias en fase estacionaria, frente al uso de bacterias en fase exponencial por Johnson *et al.*

Evidencias previas apuntan que GlpQ presenta papel inmuno-modulador durante la infección respiratoria por HiNT. La actividad glicerolfosfodiester fosfodiesterasa de esta proteína permite a HiNT disminuir la respuesta inflamatoria en el huésped al hidrolizar el mediador inflamatorio PAF. En este trabajo, se observa la virulencia reducida de HiNT375 Δ glpQ frente a HiNT375 durante la infección pulmonar de ratones CD1. Estos datos son concordantes con infecciones del tracto respiratorio superior en ratón (Hergott *et al.* 2015) y de la mucosa nasofaríngea en chinchilla (Johnson *et al.* 2011), en las que también se observa la atenuación del mutante Δ glpQ durante la infección. De este modo, la presencia de GlpQ afecta a la virulencia de HiNT durante la infección por HiNT a diferentes niveles: (i) contribuye a la resistencia de HiNT a péptidos antimicrobianos, (ii) la decoración de la membrana con PCho supone un mecanismo de evasión de la respuesta inmune del huésped por mimetismo molecular, (iii) permite la interacción de HiNT con el receptor PAF de las células eucariotas, constituyendo un mecanismo de adhesión a estas células, (iv) hidroliza PAF secretado por las células del huésped, disminuyendo la respuesta inflamatoria en beneficio propio (Hergott *et al.* 2015). Esta tipo de estrategia ya ha sido anteriormente descrita en el contexto de la infección respiratoria por *S. pneumoniae* con la proteína Pce (Cundell *et al.* 1995).

Si bien el alto grado de conservación de GlpQ en *H. influenzae* ha sido propuesto anteriormente (Janson *et al.* 1993, Song *et al.* 1995), en este trabajo se analiza por primera vez, de forma exhaustiva, la variabilidad de GlpQ en las 91 cepas de HiNT que componen la colección de aislados EPOC en estudio. Se observó que GlpQ es una proteína con escasa variabilidad y se describieron 10 nuevos polimorfismos no referenciados con anterioridad.

Así, GlpQ presenta un alto grado de conservación entre cepas, por lo es candidata a poder ser empleada como diana terapéutica de amplio espectro frente. La inhibición de la actividad de GlpQ supone una estrategia antimicrobiana prometedora desde el punto de vista del patógeno y del huésped. Por una parte, inhibiendo GlpQ, se bloquea un elemento que HiNT utiliza en su

beneficio durante la infección pulmonar. Además, es una forma de potencial la inmunidad del huésped, que HiNT reduce a través de GlpQ, al hidrolizar PAF (Hergott *et al.* 2015).

Por todo ello, este trabajo ha sentado las bases para la futura búsqueda de inhibidores de la actividad fosfodiesterasa de GlpQ. Para ello, GlpQ_{HiNT375} fue clonada, expresada y purificada utilizando un sistema de purificación por cromatografía de intercambio aniónico, de modo similar al utilizado en un estudio previo (Su *et al.* 2015). En este trabajo, se consigue un alto rendimiento en la purificación de GlpQ_{HiNT375}, así como un elevado grado de pureza, a pesar de que inicialmente la proteína no quedó retenida en la columna DEAE-celulosa. En este trabajo, el tampón utilizado durante todo el proceso de purificación fue 50 mM Tris-HCl, pH 8, mientras que en el trabajo de Su *et al.* es 10 mM Tris-HCl, pH 8, lo que no supone un cambio de fuerza iónica brusco. No obstante, esta diferencia de fuerza iónica puede causar un apantallamiento de las cargas de GlpQ_{HiNT375} y provocar que ésta no se una a la columna. Otra posibilidad es que el punto isoeléctrico de GlpQ_{HiNT375} sea distinto al predicho a partir de la secuencia, y que la proteína no tenga la carga esperada, por lo que no interaccione con la columna de intercambio aniónico. De una u otra forma, GlpQ_{HiNT375} no interaccionó con la columna DEAE-celulosa, si bien esto no ha afectado en el proceso de obtención de la proteína pura, de hecho, en este trabajo se ha purificado GlpQ_{HiNT375} con un mayor grado de pureza al observado previamente (Su *et al.* 2015). Además, el conjunto de pruebas biofísicas realizadas, así como la identificación mediante espectrometría de masas, apuntan que la identidad y estructura de GlpQ_{HiNT375} son las adecuadas.

Las pruebas biofísicas realizadas con GlpQ_{HiNT375} señalan que la proteína en estado soluble está presente en forma de monómero y de dímero. El estado de equilibrio entre ambas especies no ha sido determinado en este trabajo. La formación del dímero viene dada por la unión de cationes divalentes, que arrastra la proteína durante su proceso de obtención. Así, la presencia de cationes divalentes en el medio desplaza el equilibrio de especies hacia la forma monomérica. Estos cationes divalentes también influyen en la estabilidad de GlpQ_{HiNT375}. Diversos factores influyen en la estabilización de una proteína, y uno de ellos es la dimerización. Este proceso ya ha sido descrito como crucial para la actividad de otras proteínas de superficie (Varea *et al.* 2000). En este trabajo se presentan indicios de que la dimerización de GlpQ_{HiNT375}, favorecida por la presencia de cationes divalentes, puede estar relacionada con su estabilización. Para determinar la implicación de la dimerización en la estabilización de GlpQ_{HiNT375}, ensayos adicionales deberán ser realizados en el futuro.

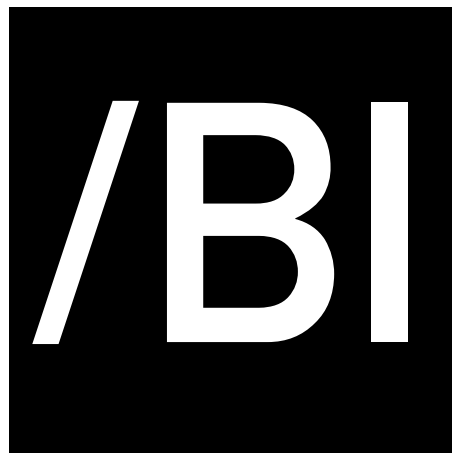
E. coli también presenta GlpQ que, si bien no se encuentra expuesta a la superficie bacteriana sino en forma soluble en el periplasma, y presenta actividad glicerolfosfodiester fosfodiesterasa como GlpQ de *H. influenzae*. Ambas proteínas tienen un alto porcentaje de identidad (**Figura D1**, Anexo IV), ya observado por otros autores (Young *et al.* 2013). En estudios previos, se ha descrito que el estado nativo de GlpQ en *E. coli* es el dímero, y que el calcio (Ca²⁺) es esencial en la actividad de esta enzima (Larson & van Loo-Bhattacharya 1988). En este trabajo, se recogen las observaciones necesarias para determinar, mediante ensayos de actividad enzimática, la implicación del proceso de dimerización, mediado por la acción de cationes divalentes, en la actividad de GlpQ_{HiNT375}.

En conjunto, en este trabajo hemos purificado y caracterizado GlpQ_{HiNT375}, sentando las bases para la puesta a punto de un posterior ensayo de actividad enzimática. Así, se realizará un escrutinio de compuestos químicos susceptibles de inhibir la actividad glicerolfosfodiester fosfodiesterasa de GlpQ_{HiNT375} como terapia antimicrobiana alternativa frente a la infección respiratoria por HiNT.

/CO

CONCLUSIONES

- Un panel de genes de *H. influenzae* que codifican enzimas que forman parte de la cadena de transporte de electrones aumenta su expresión al disminuir la concentración de O₂ en el medio de cultivo.
- La mutación del gen *pflA* que codifica la formato liasa de *H. influenzae*, provoca un aumento la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la producción de acetato y succinato, en aerobiosis, y acetato en anaerobiosis.
- La pérdida del gen *ackA* que codifica la enzima acetato kinasa provoca un desbalance metabólico en *H. influenzae* que resulta desfavorable para la bacteria desde el punto de vista energético.
- *H. influenzae* aumenta la expresión de genes relacionados con la producción de acetato y formato cuando es incapaz de producir succinato por disrupción del gen *frdA* que codifica la enzima fumarato reductasa en condiciones de alta disponibilidad de O₂.
- El fenotipo de autoagregación bacteriana está ampliamente representado en cepas clínicas de HiNT aisladas de pacientes EPOC durante episodios de exacerbación.
- La presencia de la adhesina Hap está muy conservada entre aislados clínicos de HiNT, si bien posee un alto grado de variabilidad en la región expuesta en la superficie bacteriana.
- Se ha identificado una serie clonal de HiNT aislada de un paciente EPOC que presenta variación de fase en la región promotora del operón *hmw1ABC* como estrategia patoadaptativa que modula la expresión de la invasina Hmw1A.
- Algunas variantes alélicas de la invasina Hmw1A, así como sus niveles de expresión, están, al menos parcialmente, relacionados con el fenotipo hiperinvasor de HiNT en el epitelio respiratorio humano.
- HiNT presenta un estadio intracelular no replicativo en compartimentos subcelulares ácidos de tipo endosoma tardío, que puede constituir un ambiente protector para la bacteria, independientemente de su capacidad invasiva y/u origen anatómico.
- La proteína GlpQ contribuye a la decoración de la superficie de HiNT con PCho, lo que tiene implicaciones directas en su susceptibilidad a la muerte mediada por péptidos antimicrobianos.
- GlpQ es un factor de virulencia de HiNT durante la infección pulmonar de ratones CD1.
- GlpQ, como proteína purificada, en solución y en presencia de cationes divalentes, forma dímeros, una conformación cuaternaria que dota de estabilidad a la proteína.



BIBLIOGRAFÍA

- AGRAWAL, A. & MURPHY, T.F. 2011. *Haemophilus influenzae* infections in the *H. influenzae* type b conjugate vaccine era. *Journal of clinical microbiology*, 49, 3728-3732, 10.1128/JCM.05476-11.
- AHEARN, C.P., GALLO, M.C. & MURPHY, T.F. 2017. Insights on persistent airway infection by non-typeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Pathogens and Disease*, 75, 10.1093/femspd/ftx042.
- AHRÉN, I.L., JANSON, H., FORSGREN, A. & RIESBECK, K. 2001. Protein D expression promotes the adherence and internalization of non-typeable *Haemophilus influenzae* into human monocytic cells. *Microbial Pathogenesis*, 31, 151-158, 10.1006/mpat.2001.0456.
- BARCAK, G.J., CHANDLER, M.S., REDFIELD, R.J. & TOMB, J.F. 1991. Genetic systems in *Haemophilus influenzae*. *Methods in enzymology*, 204, 321-342.
- BARENKAMP, S.J. & LEININGER, E. 1992. Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of Bordetella pertussis. *Infection and immunity*, 60, 1302-1313.
- BARENKAMP, S.J. & ST GEME, J.W. 1994. Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infection and immunity*, 62, 3320-3328.
- BARNES, P.J. 2013. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131, 636-645, 10.1016/j.jaci.2012.12.1564.
- BETSUYAKU, T., KUROKI, Y., NAGAI, K., NASUHARA, Y. & NISHIMURA, M. 2004. Effects of ageing and smoking on SP-A and SP-D levels in bronchoalveolar lavage fluid. *European Respiratory Journal*, 24, 964-970, 10.1183/09031936.04.00064004.
- BORGERDING, M. & KLUS, H. 2005. Analysis of complex mixtures--cigarette smoke. *Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*, 57 Suppl 1, 43-73.
- BOUCHET, V., HOOD, D.W., LI, J., BRISSON, J.-R., RANDLE, G.A., MARTIN, A., LI, Z., et al. 2003. Host-derived sialic acid is incorporated into *Haemophilus influenzae* lipopolysaccharide and is a major virulence factor in experimental otitis media. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 8898-8903, 10.1073/pnas.1432026100.
- BRAEKEN, D.C., HOUBEN-WILKE, S., SMID, D.E., ROHDE, G.G., DRIJKONINGEN, J.J., WOUTERS, E.F., SPRUIT, M.A. & FRANSSEN, F.M. 2016. Sputum microbiology predicts health status in COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 11, 2741-2748, 10.2147/COPD.S117079.
- BUSCHER, A.Z., GRASS, S., HEUSER, J., ROTH, R. & ST GEME, J.W. 2006. Surface anchoring of a bacterial adhesin secreted by the two-partner secretion pathway. *Molecular microbiology*, 61, 470-483, 10.1111/j.1365-2958.2006.05236.x.
- CARLET, J., RAMBAUD, C. & PULCINI, C. 2014. Save Antibiotics: a call for action of the World Alliance Against Antibiotic Resistance (WAAAR). *BMC infectious diseases*, 14, 436, 10.1186/1471-2334-14-436.
- CASTRANOVA, V., RABOVSKY, J., TUCKER, J.H. & MILES, P.R. 1988. The alveolar type II epithelial cell: a multifunctional pneumocyte. *Toxicology and applied pharmacology*, 93, 472-483.

- CELLI, B.R., MACNEE, W. & ATS/ERS TASK FORCE. 2004. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *The European respiratory journal*, 23, 932-946.
- CHARLSON, E.S., BITTINGER, K., HAAS, A.R., FITZGERALD, A.S., FRANK, I., YADAV, A., BUSHMAN, F.D. & COLLMAN, R.G. 2011. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 184, 957-963, 10.1164/rccm.201104-0655OC.
- CHIN, C.L., MANZEL, L.J., LEHMAN, E.E., HUMLICEK, A.L., SHI, L., STARNER, T.D., DENNING, G.M., MURPHY, T.F., SETHI, S. & LOOK, D.C. 2005. *Haemophilus influenzae* from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation Induce More Inflammation than Colonizers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 172, 85-91, 10.1164/rccm.200412-1687OC.
- CHOI, J., COX, A.D., LI, J., MCCREADY, W. & ULANOVA, M. 2014. Activation of innate immune responses by *Haemophilus influenzae* lipooligosaccharide. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 21, 769-776, 10.1128/CVI.00063-14.
- CHOLON, D.M., CUTTER, D., RICHARDSON, S.K., SETHI, S., MURPHY, T.F., LOOK, D.C. & ST. GEME, J.W. 2008. Serial Isolates of Persistent *Haemophilus influenzae* in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Express Diminishing Quantities of the HMW1 and HMW2 Adhesins. *Infection and Immunity*, 76, 4463-4468, 10.1128/IAI.00499-08.
- CLEMENTI, C.F. & MURPHY, T.F. 2011. Non-typeable *Haemophilus influenzae* invasion and persistence in the human respiratory tract. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 1, 1, 10.3389/fcimb.2011.00001.
- CUNDELL, D.R., GERARD, N.P., GERARD, C., IDANPAAN-HEIKKILA, I. & TUOMANEN, E.I. 1995. Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, 377, 435-438, 10.1038/377435a0.
- DAWID, S., BARENKAMP, S.J. & ST GEME, J.W. 1999. Variation in expression of the *Haemophilus influenzae* HMW adhesins: a prokaryotic system reminiscent of eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 1077-1082.
- DICKSON, R.P. & HUFFNAGLE, G.B. 2015. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLoS pathogens*, 11, e1004923, 10.1371/journal.ppat.1004923.
- DICKSON, R.P., MARTINEZ, F.J. & HUFFNAGLE, G.B. 2014. The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *Lancet (London, England)*, 384, 691-702, 10.1016/S0140-6736(14)61136-3.
- DOMENECH, M., RAMOS-SEVILLANO, E., GARCÍA, E., MOSCOSO, M. & YUSTE, J. 2013. Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of Streptococcus pneumoniae. *Infection and immunity*, 81, 2606-2615, 10.1128/IAI.00491-13.
- DUIM, B., BOWLER, L.D., EIJK, P.P., JANSEN, H.M., DANKERT, J. & VAN ALPHEN, L. 1997. Molecular variation in the major outer membrane protein P5 gene of nonencapsulated *Haemophilus influenzae* during chronic infections. *Infection and immunity*, 65, 1351-1356.
- EDWARDS, J.S. & PALSSON, B.O. 1999. Systems properties of the *Haemophilus influenzae* Rd metabolic genotype. *The Journal of biological chemistry*, 274, 17410-17416.
- EUBA, B., MOLERES, J., VIADAS, C., BARBERÁN, M., CABALLERO, L., GRILLÓ, M.-J., BENGOCHEA, J.A., et al. 2015a. Relationship between Azithromycin Susceptibility and Administration Efficacy for Nontypeable *Haemophilus influenzae* Respiratory Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 2700-2712, 10.1128/AAC.04447-14.

- EUBA, B., MOLERES, J., VIADAS, C., RUIZ DE LOS MOZOS, I., VALLE, J., BENGOCHEA, J.A. & GARMENDIA, J. 2015b. Relative Contribution of P5 and Hap Surface Proteins to Nontypable *Haemophilus influenzae* Interplay with the Host Upper and Lower Airways Tregoning, J.S., ed. *PLOS ONE*, 10, e0123154, 10.1371/journal.pone.0123154.
- FAN, X., GOLDFINE, H., LYSENKO, E. & WEISER, J.N. 2001. The transfer of choline from the host to the bacterial cell surface requires glpQ in *Haemophilus influenzae*. *Molecular microbiology*, 41, 1029-1036.
- FINK, D.L., BUSCHER, A.Z., GREEN, B., FERNSTEN, P. & ST GEME, J.W. 2003. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-terminal end of the passenger domain. *Cellular microbiology*, 5, 175-186.
- FLEISCHMANN, R.D., ADAMS, M.D., WHITE, O., CLAYTON, R.A., KIRKNESS, E.F., KERLAVAGE, A.R., BULT, C.J., TOMB, J.F., DOUGHERTY, B.A. & MERRICK, J.M. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science (New York, N.Y.)*, 269, 496-512.
- FOXWELL, A.R., KYD, J.M. & CRIPPS, A.W. 1998. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62, 294-308.
- GARCIA-BORONAT, M., DIEZ-RIVERO, C.M., REINHERZ, E.L. & RECHE, P.A. 2008. PVS: a web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery. *Nucleic acids research*, 36, W35-41, 10.1093/nar/gkn211.
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, J.A. & FRESNADILLO MARTÍNEZ, M.J. 2002. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 50 Suppl S2, 59-73.
- GARMENDIA, J., MARTÍ-LLITERAS, P., MOLERES, J., PUIG, C. & BENGOCHEA, J.A. 2012. Genotypic and phenotypic diversity of the noncapsulated *Haemophilus influenzae*: adaptation and pathogenesis in the human airways. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 15, 159-172, 10.2436/20.1501.01.169.
- GARMENDIA, J., MOREY, P. & BENGOCHEA, J.A. 2012. Impact of cigarette smoke exposure on host-bacterial pathogen interactions. *European Respiratory Journal*, 39, 467-477, 10.1183/09031936.00061911.
- GARMENDIA, J., VIADAS, C., CALATAYUD, L., MELL, J.C., MARTÍ-LLITERAS, P., EUBA, B., LLOBET, E., et al. 2014. Characterization of Nontypable *Haemophilus influenzae* Isolates Recovered from Adult Patients with Underlying Chronic Lung Disease Reveals Genotypic and Phenotypic Traits Associated with Persistent Infection Cunha, M. V., ed. *PLoS ONE*, 9, e97020, 10.1371/journal.pone.0097020.
- GRASS, S., LICHTI, C.F., TOWNSEND, R.R., GROSS, J., ST. GEME, J.W. & III, J.S.G. 2010. The *Haemophilus influenzae* HMW1C Protein Is a Glycosyltransferase That Transfers Hexose Residues to Asparagine Sites in the HMW1 Adhesin Stebbins, C.E., ed. *PLoS Pathogens*, 6, e1000919, 10.1371/journal.ppat.1000919.
- HARRISON, A., DYER, D.W., GILLASPY, A., RAY, W.C., MUNGUR, R., CARSON, M.B., ZHONG, H., et al. 2005. Genomic sequence of an otitis media isolate of nontypeable *Haemophilus influenzae*: comparative study with *H. influenzae* serotype d, strain KW20. *Journal of bacteriology*, 187, 4627-4636, 10.1128/JB.187.13.4627-4636.2005.
- HENDRIXSON, D.R. & ST GEME, J.W. 1998. The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein. *Molecular cell*, 2, 841-850.

- HERGOTT, C.B., ROCHE, A.M., NAIDU, N.A., MESAROS, C., BLAIR, I.A. & WEISER, J.N. 2015. Bacterial exploitation of phosphorylcholine mimicry suppresses inflammation to promote airway infection. *The Journal of clinical investigation*, 125, 3878-3890, 10.1172/JCI81888.
- HERRIOTT, R.M., MEYER, E.M. & VOGT, M. 1970. Defined nongrowth media for stage II development of competence in *Haemophilus influenzae*. *Journal of bacteriology*, 101, 517-524.
- HONG, W., PANG, B., WEST-BARNETTE, S. & SWORDS, W.E. 2007. Phosphorylcholine Expression by Nontypeable *Haemophilus influenzae* Correlates with Maturation of Biofilm Communities In Vitro and In Vivo. *Journal of Bacteriology*, 189, 8300-8307, 10.1128/JB.00532-07.
- HOOD, D.W., DEADMAN, M.E., ALLEN, T., MASOUD, H., MARTIN, A., BRISSON, J.R., FLEISCHMANN, R., VENTER, J.C., RICHARDS, J.C. & MOXON, E.R. 1996. Use of the complete genome sequence information of *Haemophilus influenzae* strain Rd to investigate lipopolysaccharide biosynthesis. *Molecular microbiology*, 22, 951-965.
- HUFFNAGLE, G.B., DICKSON, R.P. & LUKACS, N.W. 2017. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street. *Mucosal Immunology*, 10, 299-306, 10.1038/mi.2016.108.
- HULTGREN, S.J., ABRAHAM, S., CAPARON, M., FALK, P., ST GEME, J.W. & NORMARK, S. 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell*, 73, 887-901.
- JANSON, H., RUAN, M. & FORSGREN, A. 1993. Limited diversity of the protein D gene (hpd) among encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae* strains. *Infection and immunity*, 61, 4546-4552.
- JOHNSON, R.W., MCGILLIVARY, G., DENOËL, P., POOLMAN, J. & BAKALETZ, L.O. 2011. Abrogation of nontypeable *Haemophilus influenzae* Protein D function reduces phosphorylcholine decoration, adherence to airway epithelial cells, and fitness in a chinchilla model of otitis media. *Vaccine*, 29, 1211-1221, 10.1016/j.vaccine.2010.12.003.
- KITA, H. & NIKAIIDO, H. 1973. Structure of cell wall lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*. IV. Anomeric configuration of L-rhamnose residues and its taxonomic implications. *Journal of bacteriology*, 113, 672-679.
- LARSON, T.J. & VAN LOO-BHATTACHARYA, A.T. 1988. Purification and characterization of glpQ-encoded glycerophosphodiester phosphodiesterase from *Escherichia coli* K-12. *Archives of biochemistry and biophysics*, 260, 577-584.
- LAUE, T., SHAH, B., RIDGEWAY, T. & PELLETIER, S. 1992. Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins.
- LIAO, Y.-D., JENG, J.-C., WANG, C.-F., WANG, S.-C. & CHANG, S.-T. 2004. Removal of N-terminal methionine from recombinant proteins by engineered *E. coli* methionine aminopeptidase. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 13, 1802-1810, 10.1110/ps.04679104.
- LÓPEZ-GÓMEZ, A., CANO, V., MORANTA, D., MOREY, P., GARCÍA DEL PORTILLO, F., BENGOCHEA, J.A. & GARMENDIA, J. 2012. Host cell kinases, $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrins, and Rac1 signalling on the microtubule cytoskeleton are important for non-typable *Haemophilus influenzae* invasion of respiratory epithelial cells. *Microbiology (Reading, England)*, 158, 2384-2398, 10.1099/mic.0.059972-0.
- LYSENKO, E., RICHARDS, J.C., COX, A.D., STEWART, A., MARTIN, A., KAPOOR, M. & WEISER, J.N. 2000. The position of phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* affects binding and sensitivity to C-reactive protein-mediated killing. *Molecular microbiology*, 35, 234-245.

- LYSENKO, E.S., GOULD, J., BALS, R., WILSON, J.M. & WEISER, J.N. 2000. Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infection and immunity*, 68, 1664-1671.
- MANZ, W., AMANN, R., LUDWIG, W., WAGNER, M. & SCHLEIFER, K.-H. 1992. Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. *Systematic and Applied Microbiology*, 15, 593-600, 10.1016/S0723-2020(11)80121-9.
- MARSLAND, B.J. & GOLLWITZER, E.S. 2014. Host–microorganism interactions in lung diseases. *Nature Reviews Immunology*, 14, 827-835, 10.1038/nri3769.
- MATHERS, C.D., LONCAR, D., BOREHAM, J., THUN, M., HEATH, J. & DOLL, R. 2006. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030 Samet, J., ed. *PLoS Medicine*, 3, e442, 10.1371/journal.pmed.0030442.
- MAUGHAN, H. & REDFIELD, R.J. 2009. Extensive variation in natural competence in *Haemophilus influenzae*. *Evolution*, 63, 1852-1866, 10.1111/j.1558-5646.2009.00658.x.
- MEHTA, S.K., PLAUT, A.G., CALVANICO, N.J. & TOMASI, T.B. 1973. Human Immunoglobulin A: Production of an Fc Fragment by an Enteric Microbial Proteolytic Enzyme. *The Journal of Immunology*, 111.
- MELL, J.C., VIADAS, C., MOLERES, J., SINHA, S., FERNÁNDEZ-CALVET, A., PORSCH, E.A., ST. GEME, J.W., NISLOW, C., REDFIELD, R.J. & GARMENDIA, J. 2016. Transformed Recombinant Enrichment Profiling Rapidly Identifies HMW1 as an Intracellular Invasion Locus in *Haemophilus influenzae* Salama, N.R., ed. *PLOS Pathogens*, 12, e1005576, 10.1371/journal.ppat.1005576.
- MIKHAIL, I., YILDIRIM, H.H., LINDAHL, E.C.H. & SCHWEDA, E.K.H. 2005. Structural characterization of lipid A from nontypeable and type f *Haemophilus influenzae*: Variability of fatty acid substitution. *Analytical Biochemistry*, 340, 303-316, 10.1016/j.ab.2005.02.020.
- MONSÓ, E. 2017. The Respiratory Microbiome: Beyond the Culture. *Archivos de Bronconeumología (English Edition)*, 10.1016/j.arbr.2016.11.038.
- MOREY, P., CANO, V., MARTI-LLITERAS, P., LOPEZ-GOMEZ, A., REGUEIRO, V., SAUS, C., BENGOCHEA, J.A. & GARMENDIA, J. 2011. Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology*, 157, 234-250, 10.1099/mic.0.040451-0.
- MOREY, P., VIADAS, C., EUBA, B., HOOD, D.W., BARBERAN, M., GIL, C., GRILLO, M.J., BENGOCHEA, J.A. & GARMENDIA, J. 2013. Relative Contributions of Lipooligosaccharide Inner and Outer Core Modifications to Nontypeable *Haemophilus influenzae* Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 81, 4100-4111, 10.1128/IAI.00492-13.
- MURPHY, T.F., BRAUER, A.L., SCHIFFMACHER, A.T. & SETHI, S. 2004. Persistent Colonization by *Haemophilus influenzae* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170, 266-272, 10.1164/rccm.200403-354OC.
- MURPHY, T.F., SETHI, S., KLINGMAN, K.L., BRUEGGEMANN, A.B. & DOERN, G.V. 1999. Simultaneous Respiratory Tract Colonization by Multiple Strains of Nontypeable *Haemophilus influenzae* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Implications for Antibiotic Therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 180, 404-409, 10.1086/314870.
- MURRAY, C.J. & LOPEZ, A.D. 1997. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, 349, 1436-1442, 10.1016/S0140-6736(96)07495-8.

- NEEF, A., ZAGLAUER, A., MEIER, H., AMANN, R., LEMMER, H. & SCHLEIFER, K.H. 1996. Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 62, 4329-4339.
- NOOR, E., EDEN, E., MILO, R. & ALON, U. 2010. Central Carbon Metabolism as a Minimal Biochemical Walk between Precursors for Biomass and Energy. *Molecular Cell*, 39, 809-820, 10.1016/j.molcel.2010.08.031.
- OTHMAN, D.S.M.P., SCHIRRA, H., MCEWAN, A.G. & KAPPLER, U. 2014. Metabolic versatility in *Haemophilus influenzae*: a metabolomic and genomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, 5, 69, 10.3389/fmicb.2014.00069.
- PELTOLA, H. 2000. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clinical microbiology reviews*, 13, 302-317.
- PILETTE, C., OUADRHIRI, Y., DIMANCHE, F., VAERMAN, J.-P. & SIBILLE, Y. 2003. Secretory Component Is Cleaved by Neutrophil Serine Proteinases but its Epithelial Production Is Increased by Neutrophils through NF- κ B- and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Mechanisms. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 28, 485-498, 10.1165/rcmb.4913.
- PITTMAN, M. 1931. Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. *The Journal of experimental medicine*, 53, 471-492, 10.1084/jem.53.4.471.
- PLAUT, A.G., GILBERT, J. V, ARTENSTEIN, M.S. & CAPRA, J.D. 1975. Neisseria gonorrhoeae and neisseria meningitidis: extracellular enzyme cleaves human immunoglobulin A. *Science (New York, N.Y.)*, 190, 1103-1105.
- POOLE, J., FOSTER, E., CHALONER, K., HUNT, J., JENNINGS, M.P., BAIR, T., KNUDTSON, K., et al. 2013. Analysis of nontypeable *Haemophilus influenzae* phase-variable genes during experimental human nasopharyngeal colonization. *The Journal of infectious diseases*, 208, 720-727, 10.1093/infdis/jit240.
- PRICE, E.P., SAROVICH, D.S., NOSWORTHY, E., BEISSBARTH, J., MARSH, R.L., PICKERING, J., KIRKHAM, L.-A.S., KEIL, A.D., CHANG, A.B. & SMITH-VAUGHAN, H.C. 2015. *Haemophilus influenzae*: using comparative genomics to accurately identify a highly recombinogenic human pathogen. *BMC Genomics*, 16, 641, 10.1186/s12864-015-1857-x.
- RAGHUNATHAN, A., PRICE, N.D., GALPERIN, M.Y., MAKAROVA, K.S., PURVINE, S., PICONE, A.F., CHERNY, T., et al. 2004. *In Silico* Metabolic Model and Protein Expression of *Haemophilus influenzae* Strain Rd KW20 in Rich Medium. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 8, 25-41, 10.1089/153623104773547471.
- RAO, V.K., KRASAN, G.P., HENDRIXSON, D.R., DAWID, S. & ST GEME, J.W. 1999. Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS microbiology reviews*, 23, 99-129.
- RODRÍGUEZ-ARCE, I., MARTÍ, S., EUBA, B., FERNÁNDEZ-CALVET, A., MOLERES, J., LÓPEZ-LÓPEZ, N., BARBERÁN, M., et al. 2017. Inactivation of the Thymidylate Synthase thyA in Non-typeable *Haemophilus influenzae* Modulates Antibiotic Resistance and Has a Strong Impact on Its Interplay with the Host Airways. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 266, 10.3389/fcimb.2017.00266.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. (DAVID W. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- SANTOS, S., MARIN, A., SERRA-BATLLES, J., DE LA ROSA, D., SOLANES, I., POMARES, X., LÓPEZ-SÁNCHEZ, M., MUÑOZ-ESQUERRE, M. & MIRAVITLLES, M. 2016. Treatment of patients with COPD and recurrent exacerbations: the role of infection and inflammation. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease*, 11, 515-525, 10.2147/COPD.S98333.
- SCHUCK, P. & ROSSMANITH, P. 2000. Determination of the sedimentation coefficient distribution by least-squares boundary modeling. *Biopolymers*, 54, 328-341, 10.1002/1097-0282(20001015)54:5<328::AID-BIP40>3.0.CO;2-P.
- SCHWEDA, E., RICHARDS, J., HOOD, D. & MOXON, E. 2007. Expression and structural diversity of the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: Implication in virulence. *International Journal of Medical Microbiology*, 297, 297-306, 10.1016/j.ijmm.2007.03.007.
- SEEMUNGAL, T.A., DOLANDSON, G.C., BHOWMIK, A., JEFRIEES, D.J. & WEDZICHA, J.A. 2000. Time Course and Recovery of Exacerbations in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 161, 1608-1613, 10.1164/ajrccm.161.5.9908022.
- SETHI, S. 2004. Bacteria in Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Phenomenon or Epiphenomenon? *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1, 109-114, 10.1513/pats.2306029.
- SETHI, S., EVANS, N., GRANT, B.J.B. & MURPHY, T.F. 2002. New Strains of Bacteria and Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine*, 347, 465-471, 10.1056/NEJMoa012561.
- SETHI, S. & MURPHY, T.F. 2008. Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine*, 359, 2355-2365, 10.1056/NEJMra0800353.
- SMALDONE, G.C., FOSTER, W.M., O'RIORDAN, T.G., MESSINA, M.S., PERRY, R.J. & LANGENBACK, E.G. 1993. Regional impairment of mucociliary clearance in chronic obstructive pulmonary disease. *Chest*, 103, 1390-1396.
- SONG, X.M., FORSGREN, A. & JANSON, H. 1995. The gene encoding protein D (hpd) is highly conserved among *Haemophilus influenzae* type b and nontypeable strains. *Infection and immunity*, 63, 696-699.
- SPAHICH, N.A., ST GEME, J.W. & III. 2011. Structure and function of the *Haemophilus influenzae* autotransporters. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 1, 5, 10.3389/fcimb.2011.00005.
- ST. GEME, J.W. & FALKOW, S. 1994. A *Haemophilus influenzae* IgA protease-like protein promotes intimate interaction with human epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 14, 217-233, 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01283.x.
- ST GEME, J.W., FALKOW, S., BARENKAMP, S.J. & BARENKAMP, S.J. 1993. High-molecular-weight proteins of nontypable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 2875-2879.
- STAPLES, M., GRAHAM, R.M.A. & JENNISON, A. V. 2017. Characterisation of invasive clinical *Haemophilus influenzae* isolates in Queensland, Australia using whole-genome sequencing. *Epidemiology and Infection*, 145, 1-10, 10.1017/S0950268817000450.
- SU, Q., YI, Y., QIU, F., LU, X., DING, J., JIA, Z., TIAN, R., GAO, Y. & BI, S. 2015. Immune Responses to HBsAg Conjugated to Protein D of Non-Typeable *Haemophilus influenzae* in Mice Turner, S.J., ed. *PLOS ONE*, 10, e0117736, 10.1371/journal.pone.0117736.

- TABOR, S. 2001. Expression Using the T7 RNA Polymerase/Promoter System. *En Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., Unit16.2., 10.1002/0471142727.mb1602s11.
- TATUSOV, R.L., MUSHEGIAN, A.R., BORK, P., BROWN, N.P., HAYES, W.S., BORODOVSKY, M., RUDD, K.E. & KOONIN, E. V. 1996. Metabolism and evolution of *Haemophilus influenzae* deduced from a whole-genome comparison with *Escherichia coli*. *Current Biology*, 6, 279-291, 10.1016/S0960-9822(02)00478-5.
- TOLEDO-ARANA, A., DUSSURGET, O., NIKITAS, G., SESTO, N., GUET-REVILLET, H., BALESTRINO, D., LOH, E., et al. 2009. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature*, 459, 950-956, 10.1038/nature08080.
- TRACY, E., YE, F., BAKER, B.D. & MUNSON, R.S. 2008. Construction of non-polar mutants in *Haemophilus influenzae* using FLP recombinase technology. *BMC Molecular Biology*, 9, 101, 10.1186/1471-2199-9-101.
- VAREA, J., SAIZ, J.L., LÓPEZ-ZUMEL, C., MONTERROSO, B., MEDRANO, F.J., ARRONDO, J.L., ILOORO, I., LAYNEZ, J., GARCIA, J.L. & MENÉNDEZ, M. 2000. Do sequence repeats play an equivalent role in the choline-binding module of pneumococcal LytA amidase? *Journal of Biological Chemistry*, 275, 26842-26855, 10.1074/jbc.M004379200.
- VOGELMEIER, C.F., CRINER, G.J., MARTINEZ, F.J., ANZUETO, A., BARNES, P.J., BOURBEAU, J., CELLI, B.R., et al. 2017. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 195, 557-582, 10.1164/rccm.201701-0218PP.
- WATSON, M.E., BURNS, J.L. & SMITH, A.L. 2004. Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology*, 150, 2947-2958, 10.1099/mic.0.27230-0.
- WEISER, J.N., SHCHEPETOV, M. & CHONG, S.T. 1997. Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infection and immunity*, 65, 943-950.
- YOUNG, N.M., FOOTE, S.J. & WAKARCHUK, W.W. 2013. Review of phosphocholine substituents on bacterial pathogen glycans: Synthesis, structures and interactions with host proteins. *Molecular Immunology*, 56, 563-573, 10.1016/j.molimm.2013.05.237.

/AN

ANEXOS

ANEXO I

Tabla A1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>Haemophilus influenzae</i>		
HiNT375	Aislado clínico de otitis media.	(Bouchet <i>et al.</i> , 2003)
Hi RdKW20	Cepa de laboratorio no patógena. Cepa decapsulada proveniente de una cepa de <i>H. influenzae</i> serotipo b.	(Fleischmann <i>et al.</i> , 1995)
HiNT 86-028NP	Aislado clínico de otitis media crónica.	(Harrison <i>et al.</i> , 2005)
HiNT411	Aislado clínico de EPOC con exacerbación. Primera cepa de un grupo clonal de 3 aislados.	(Garmendia <i>et al.</i> , 2014)
P651	Aislado clínico de EPOC con exacerbación. Primera cepa de un grupo clonal de 4 aislados. (Grupo clonal 9, Tabla 9)	Josefina Linares, HUB, Barcelona
P652	Aislado clínico de EPOC con exacerbación. Segunda cepa de un grupo clonal de 4 aislados. (Grupo clonal 9, Tabla 9)	Josefina Linares, HUB, Barcelona
P653	Aislado clínico de EPOC con exacerbación. Tercera cepa de un grupo clonal de 4 aislados. (Grupo clonal 9, Tabla 8)	Josefina Linares, HUB, Barcelona
P654	Aislado clínico de EPOC con exacerbación. Cuarta cepa de un grupo clonal de 4 aislados. (Grupo clonal 9, Tabla 9)	Josefina Linares, HUB, Barcelona
HiNT 375 Δ lic1BC	Cepa mutante de HiNT generada mediante doble recombinación homóloga, sustituyendo los genes <i>lic1B</i> y <i>lic1C</i> por un fragmento de ADN que contiene un gen de resistencia a eritromicina.	(Morey <i>et al.</i> , 2011)
HiNT 375 Δ glpQ	Cepa mutante de HiNT generada mediante doble recombinación homóloga, sustituyendo el gen <i>glpQ</i> por un fragmento de ADN que contiene un gen de resistencia a espectinomicina.	Este trabajo
Hi RdKW20 Δ glpQ	Cepa mutante de Hi generada mediante doble recombinación homóloga, sustituyendo el gen <i>glpQ</i> por un fragmento de ADN que contiene un gen de resistencia a espectinomicina.	Este trabajo
Hi RdKW20 Δ pflA	Cepa mutante de Hi generada mediante doble recombinación homóloga, sustituyendo el gen <i>pflA</i> por un fragmento de ADN que contiene un gen de resistencia a espectinomicina.	Grupo de investigación

Hi RdKW20 Δ <i>ackA</i>	Cepa mutante de Hi generada mediante doble recombinación homóloga, sustituyendo el gen <i>ackA</i> por un fragmento de ADN que contiene un gen de resistencia a espectinomicina.	Grupo de investigación
Hi RdKW20 Δ <i>frdA</i>	Cepa mutante de Hi generada mediante doble recombinación homóloga, sustituyendo el gen <i>frdA</i> por un fragmento de ADN que contiene un gen de resistencia a eritromicina.	Grupo de investigación
HiNT 411 Δ <i>pflA</i>	Cepa mutante de HiNT generada mediante doble recombinación homóloga, sustituyendo el gen <i>pflA</i> por un fragmento de ADN que contiene un gen de resistencia a espectinomicina.	Grupo de investigación
HiNT 411 Δ <i>ackA</i>	Cepa mutante de HiNT generada mediante doble recombinación homóloga, sustituyendo el gen <i>ackA</i> por un fragmento de ADN que contiene un gen de resistencia a espectinomicina.	Grupo de investigación
HiNT 411 Δ <i>frdA</i>	Cepa mutante de HiNT generada mediante doble recombinación homóloga, sustituyendo el gen <i>frdA</i> por un fragmento de ADN que contiene un gen de resistencia a eritromicina.	Grupo de investigación

Escherichia coli

<i>E. coli</i> TOP 10	Cepa usada en experimentos de clonaje.	Thermo Fisher Scientific
<i>E. coli</i> SW102	Cepa derivada de DY380, usada para la generación de plásmidos por recombinación homóloga. Contiene un profago λ defectivo con los genes de recombinasas <i>exo</i> , <i>bet</i> y <i>gam</i> , cuya expresión es controlada por el represor termosensible <i>c/857</i> .	(Tracy <i>et al.</i> , 2008)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Cepa usada para transformar y sobreexpresar proteínas recombinantes. Deficiente para las proteasas Lon y OmpT. Contiene el lisogen λ DE3 que codifica para la ARN polimerasa del fago T7, que con presencia de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) en el medio, expresa proteínas recombinantes clonadas bajo el control del promotor T7.	NEB
<i>E. coli</i> BL21-pT7.7/ <i>glpQ</i> _{NTHI375}	Cepa transformada con el plásmido pT7.7/ <i>glpQ</i> _{NTHI375} . Esta cepa se usó para la expresión de GlpQ (inducida por IPTG) y purificación (por cromatografía de intercambio iónico).	Este trabajo

Tabla A2. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Descripción	Gen de R	Referencia
pJET1.2	Vector comercial de clonaje.	Amp	Thermo Fisher Scientific
pJET1.2- glpQ _{RdKW20}	pJET1.2 en el que se clonó un inserto de 3.095 pb que contienen el gen <i>glpQ_{RdKW20}</i> (1.095 pb) y regiones flanqueantes de 1.000 pb.	Amp	Este trabajo
pJET1.2- glpQ _{HiNT375}	pJET1.2 en el que se clonó un inserto de 3.095 pb que contienen el gen <i>glpQ_{HiNT375}</i> (1.095 pb) y regiones flanqueantes de 1.000 pb.	Amp	Este trabajo
pRSM2832	Derivado de pKD13 que porta un gen de resistencia a espectinomicina flanqueado por sitios FRT	Spec	(Tracy <i>et al.</i> , 2008)
pJET1.2- glpQ _{RdKW20::spec}	pJET1.2 en el que se clonó un cassette de disrupción génica <i>glpQ_{RdKW20::spec}</i> .	Amp, Spec	Este trabajo
pJET1.2- glpQ _{HiNT375::spec}	pJET1.2 en el que se clonó un cassette de disrupción génica <i>glpQ_{RdKW20::spec}</i> .	Amp, Spec	Este trabajo
pT7.7	Vector comercial de expresión.	Amp	(Tabor, 2001)
pT7.7- glpQ _{NTHi375}	pT7.7 en el que se clonó un inserto de 1060 pb que contienen el gen <i>glpQ_{HiNT375}</i> truncado (1038 pb) y regiones flanqueantes con sitios de corte de enzimas de restricción (<i>NdeI</i> y <i>BamHI</i>).	Amp	Este trabajo

Tabla A3. Cebadores utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Utilizado para	Referencia
glpQ_Rd_F1	AGCAATAATTATAGCTGGAATATTC	PCR	Este trabajo
glpQ_R1	TAAATTGCCGCAATTGCTTTTTTG	PCR	Este trabajo
glpQ_375_F1	ATTTTCTTCAGCACTCACGGTATTG	PCR	Este trabajo
glpQ_Rd_F2	TCTGTAAAATAGGTAATGATCCTAACAAATATATAA GGAGAATAAGTATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	PCR	Este trabajo
glpQ_Rd_R2	GGTATGTTTACCACGGTTGTGAGGGATATTATTTT ATTCCTTTAAGAATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	PCR	Este trabajo
glpQ_375_F2	CTAAAAACCTCATAAAAAATTTACCGCACCTCTCAAGG AGAAAATACTTATGATTCCGGGGATCCGTCGACC	PCR	Este trabajo
glpQ_375_R2	GGTATGTTTACCTACGGTTATAATAGAAATTATTTT ATTCCTTTAAGAATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	PCR	Este trabajo
glpQ_Ndel_F	GGAAATTCATATGAGCAGCCATTATC	PCR	Este trabajo
glpQ_BamHI_R	CCGGGATCCTTATTTTATTCCTTT	PCR	Este trabajo
hmw1A_F	TGTATCACTAAATGGAACCTGGTAGAGG	qPCR	Este trabajo
hmw1A_R	CCCTGGCGATGAAAATAAGA	qPCR	Este trabajo
hmw2A_F	ATCCCATGTTCCGAAGGATA	qPCR	Este trabajo
hmw2A_R	AATTTTGCCACCAAGAGTG	qPCR	Este trabajo
hmw2A_F_NP	TCTGTTTTAGCGAGCGGTTT	qPCR	Este trabajo
hmw2A_R_NP	GAATACGGCGGAGTTGTTGT	qPCR	Este trabajo
pfkA_qPCR_F	CGATATATTCACAACCGCCAG	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
pfkA_qPCR_R	TCGACCGTTTACGTGATACAT	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
pykA_qPCR_F	TTGCAGACATCGCAACAGATT	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
pykA_qPCR_R	CAGTGGCAGCAATGGCTAG	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
zwf_qPCR_F	CTCTTCCACGCCAATAGATTC	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
zwf_qPCR_R	GAAACCGTTCAAACCTTGCTC	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
aceF_qPCR_F	AGCCAGCACCAATTTGCTACAC	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
aceF_qPCR_R	GTCGTAAGGTCGTATCGTTA	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
pflA_qPCR_F	CTCTTTACAAGCACGGAACC	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
pflA_qPCR_R	AAAGAAGTCGTGACTTATCGC	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
ackA_qPCR_F	CCAATTAAGTGAGCAGGTTG	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
ackA_qPCR_R	TCGTATCGTTCACGGTGGCG	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
ldhA_qPCR_F	CTGGCGTTGCTGGGCAATGA	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
ldhA_qPCR_R	TCTTGGCGTACGATCCTTTCA	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
fdxG_qPCR_F	GTGGCGGTATTAACGCATTAC	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
fdxG_qPCR_R	CGTAAGAGGTATCTCTATCGT	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
ndh_qPCR_F	GGAAATGGGCACCAATGTGCA	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
ndh_qPCR_R	CGAACCCCTGCTGCCAAAC	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
nqrB_qPCR_F	TGCAACTGGGGCTCTAAAAT	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
nqrB_qPCR_R	ACTTCGTGACCACGAACCAC	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
lldD_qPCR_F	ATCATACGCCAGAATGGGTG	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
lldD_qPCR_R	ACGGTCGATATGCCTACTCCA	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
dld_qPCR_F	AGCGGAAAGGTGTCTAAACGA	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
dld_qPCR_R	TCGTCAAGTTGATGAAGGCTC	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
cydA_qPCR_F	AACCAACCACACTCAATGGCA	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
cydA_qPCR_R	ACTTACATTCGGCGCATTTGT	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
cydB_qPCR_F	CGTGAGTGACAAGCATTGATA	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
cydB_qPCR_R	GCGTTCCATTCCATTTTAACG	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
dmsA_qPCR_F	CAAGCAGAACCTGATGATCA	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
dmsA_qPCR_R	AGTAAACTGTGGTAGCCGTTG	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
napA_qPCR_F	TGGTCGCGGTCACGGTCA	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
napA_qPCR_R	GGATCATAGCCTTCACGGTAA	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
torZ_qPCR_F	AACAAACGGGTTACCACCTGC	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
torZ_qPCR_R	CCATTAGCGCGTATTGCTGAT	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
nrfA_qPCR_F	GCCGTGTAACCTGAAGATGC	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
nrfA_qPCR_R	ATCCCTGTTTCGTCAGTTGTT	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
frdA_qPCR_F	GCCGTGTAACCTGAAGATGC	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
frdA_qPCR_R	ATCCCTGTTTCGTCAGTTGTT	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
16S_qPCR_F	GGCGTTGATGACCGTGA AAC	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
16S_qPCR_R	GCCAGTAATAATCGCCCTCTTAG	qPCR	(Othman <i>et al.</i> 2014)
p_hmw1A_seq_F	ATAGGTGTTGCCAAAAATAA	Secuenciación	Este trabajo
p_hmw1A_seq_R	ACGCACCTTCATGCGAGCAGG	Secuenciación	Este trabajo
p_hmw2A_seq_F	TGGACATAGCCGACACCTGTA	Secuenciación	Este trabajo
p_hmw2A_seq_R	ACGCACCTTCATGCGAGCAGG	Secuenciación	Este trabajo
glpQ_seq_F	GAGACCACAACGGTTTTCCCTCTAG	Secuenciación	Este trabajo
glpQ_seq_R	CTCATGTTTGACACGTTATCATC	Secuenciación	Este trabajo

ANEXO II

Tabla B1. Comparativa de los niveles de expresión génica entre aerobiosis y anaerobiosis en RdKW20 (arriba), y HiNT411 (abajo).

RdKW20 aerobiosis vs anaerobiosis		
Gen	P-value	Significación estadística
<i>pfkA</i>	0,0745282	-
<i>zwf</i>	0,0186397	-
<i>pykA</i>	0,971376	-
<i>aceF</i>	0,244271	-
<i>ackA</i>	7,52454E-05	****
<i>pflA</i>	0,560329	-
<i>ldhA</i>	0,554073	-
<i>fdxG</i>	0,98552	-
<i>nqrB</i>	0,0893504	-
<i>dld</i>	0,125418	-
<i>lldD</i>	0,000693525	***
<i>cydA</i>	0,0187869	-
<i>cydB</i>	0,000631078	***
<i>nrfA</i>	1,06926E-05	****
<i>frdA</i>	5,45983E-09	****
<i>dmsA</i>	6,09473E-08	****
<i>napA</i>	0,0886322	-
<i>torZ</i>	0,000186431	***

HiNT411 aerobiosis vs anaerobiosis		
Gen	P-value	Significación estadística
<i>pfkA</i>	0,000240262	***
<i>zwf</i>	0,0206371	-
<i>pykA</i>	0,0433151	-
<i>aceF</i>	0,203153	-
<i>ackA</i>	0,139388	-
<i>pflA</i>	0,628775	-
<i>ldhA</i>	0,978887	-
<i>fdxG</i>	0,700872	-
<i>nqrB</i>	0,0799757	-
<i>dld</i>	0,00635713	-
<i>lldD</i>	0,724115	-
<i>cydA</i>	2,84233E-05	****
<i>cydB</i>	0,000238004	***
<i>nrfA</i>	1,99423E-05	****
<i>frdA</i>	8,9969E-08	****
<i>dmsA</i>	1,51661E-06	****
<i>napA</i>	0,610529	-
<i>torZ</i>	0,00205431	**

*CLAVE: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001

Tabla B2. Comparativa de los niveles de expresión génica entre RdKW20 y mutantes en aerobiosis.

Gen	Comparación	P-value	Significación estadística
<i>pfkA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,8062	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,8483	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,5009	-
<i>zwf</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,9969	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,8012	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,1823	-
<i>pykA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,893	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9985	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9959	-
<i>pckA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	> 0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	> 0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	> 0,9999	-
<i>aceF</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,7437	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	< 0,0001	****
<i>ackA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,8841	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	< 0,0001	****
<i>pflA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,9994	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9874	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9943	-
<i>ldhA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	> 0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,6609	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9984	-
<i>fdxG</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	> 0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9906	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9979	-
<i>nqrB</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,8998	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,1241	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,5287	-
<i>dld</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,9914	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,3238	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,0008	***
<i>lldD</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,0067	**
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,0011	**
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,0063	**
<i>cydA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,2469	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,0002	***
<i>cydB</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,1352	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	< 0,0001	****
<i>nrfA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,6106	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	< 0,0001	****
<i>frdA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,9831	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9875	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	< 0,0001	****
<i>dmsA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,6699	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,2864	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,6491	-
<i>napA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	> 0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,7861	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,2998	-
<i>torZ</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pf1A</i>	0,9281	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9265	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9991	-

*CLAVE: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001

Tabla B3. Comparativa de los niveles de expresión génica entre RdKW20 y mutantes en anaerobiosis.

Gen	Comparación	P-value	Significación estadística
<i>pfkA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,0141	*
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,0087	**
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,7196	-
<i>zwf</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,0512	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,0055	**
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9924	-
<i>pykA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,9877	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9711	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,6779	-
<i>aceF</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,8615	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,0001	***
<i>ackA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,8467	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,5391	-
<i>pflA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,8556	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,923	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9875	-
<i>ldhA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,9943	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9219	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9878	-
<i>fdxG</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	> 0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	> 0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	> 0,9999	-
<i>nqrB</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,0932	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,1535	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9266	-
<i>did</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,9975	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9996	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9999	-
<i>lldD</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,1611	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9177	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,0281	*
<i>cydA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,0324	*
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,0233	*
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,311	-
<i>cydB</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,6622	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	> 0,9999	-
<i>nrfA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,0001	***
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	< 0,0001	****
<i>frdA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	< 0,0001	****
<i>dmsA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,0819	-
<i>napA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,2934	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,4306	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,5796	-
<i>torZ</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,0003	***
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,8684	-

*CLAVE: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001

Tabla B4. Comparativa de los niveles de expresión génica entre HiNT411 y mutantes en aerobiosis.

Gen	Comparación	P-value	Significación estadística
<i>pfkA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,46	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9461	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,0319	*
<i>zwf</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,4896	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,2636	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,8475	-
<i>pykA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,0596	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9985	-
<i>aceF</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,002	**
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,001	***
<i>ackA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,0048	**
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,001	**
<i>pflA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,996	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9829	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9725	-
<i>ldhA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	> 0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9994	-
<i>fdxG</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	> 0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,991	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9992	-
<i>nqrB</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,1215	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,2178	-
<i>dld</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,1889	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,0347	*
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,0033	**
<i>lldD</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,4666	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,4733	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,4153	-
<i>cydA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,9212	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,0015	**
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,0662	-
<i>cydB</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,1713	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9705	-
<i>nrfA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,9582	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,0087	**
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	< 0,0001	****
<i>frdA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,0237	*
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,2687	-
<i>dmsA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	0,0017	**
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,6391	-
<i>napA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	> 0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9886	-
<i>torZ</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pflA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,7523	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,012	*

*CLAVE: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001

Tabla B5. Comparativa de los niveles de expresión génica entre HiNT411 y mutantes en anaerobiosis.

Gen	Comparación	P-value	Significación estadística
<i>pfkA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	< 0,0001	****
<i>zwf</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	0,0009	***
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9684	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9941	-
<i>pykA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	0,1622	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,978	-
<i>aceF</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,4345	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,2846	-
<i>ackA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,987	-
<i>pfIA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	0,8965	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	> 0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9972	-
<i>ldhA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	0,9957	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9996	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9993	-
<i>fdxG</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	> 0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	> 0,9999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	> 0,9999	-
<i>nqrB</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	0,9921	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,999	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,9999	-
<i>did</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9986	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,2893	-
<i>lldD</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	0,9775	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9873	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,7737	-
<i>cydA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	0,0001	***
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,0086	**
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,0004	***
<i>cydB</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	0,9631	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,0351	*
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,0019	**
<i>nrfA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	0,994	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,7414	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	< 0,0001	****
<i>frdA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	0,9983	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,9591	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	< 0,0001	****
<i>dmsA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,8729	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,0003	***
<i>napA</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	0,7644	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	0,5041	-
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	0,993	-
<i>torZ</i>	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>pfIA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>ackA</i>	< 0,0001	****
	RdKW20 vs RdKW20Δ <i>frdA</i>	< 0,0001	****

*CLAVE: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** p < 0,0001

alelo_23 YKVVKRYNYQKDE--RHHFATDYQHPRLAKFVTEVAPIDMVTDRGHLYANLEQYPMRVRA
alelo_18 YKVVKRYNYKND--THRYMTDYQHPRLAKFVTEVAPIEMVSYMNGNTYIDLERYPIRVRA
alelo_17 YKVVKRYNYKND--THRYMTDYQHPRLAKFVTEVAPIEMVSYMNGNTYIDLERYPIRVRA
alelo_1 YKVVKRYNYKND--THRYMTDYQHPRLAKFVTEVAPIEMVSYMNGNTYIDLERYPIRVRA
alelo_24 YKVVKRYNYKND--THRYMTDYQHPRLAKFVTEVAPIEMVSYMNGNTYIDLERYPIRVRA
alelo_13 YKVVKRYNYKND--KHHYLSDYQHPRLAKFVTEVAPIEMVSYMNGNTYIDLERYPIRVRA
alelo_9 YKVVKRYNYKSGD--R--QYNDYQHPRLAKFVTEVAPIEMVSYMNGNHYKFNQYPLRVRV
alelo_15 YKVVKRYNYKSGD--R--QYNDYQHPRLAKFVTEVAPIEMVSYMNGNHYKFNQYPLRVRV
alelo_2 YQIAKRNNYKPDQGRNHYDGDYHMPRLHKKFVTEIEPIGMTPLVDGKVIYANKEDYPERVRI
alelo_21 YQIVKRNNYKQDN--EHYHEDYHNPRLNKFVTDATPVEMTINMNGNTYGNITDYDPRVRI
alelo_27 YQIVKRNNYKQDK--EHYHEDYHNPRLNKFVTDAPVEMTINMNGNTYGNITDYDPRVRI
alelo_31 YKIVKRNNYKKN--LHPYEDDYHNPRLHKKFVTEAAPIDMTSNMNGSTYSDRTKYPERVRI
alelo_34 YKIVKRNNYKKN--LHPYEDDYHNPRLHKKFVTEAAPIDMTSNMNGSTYSDRTKYPERVRI
alelo_7 YKIAKRNNYKNDQ--THPYEKDYHNPRLHKKFVTEAAPIDMTSDMNGNKYTDRTKYPERVRI
alelo_25 YKIAKRNNYKNDQ--THPYEKDYHNPRLHKKFVTEAAPIDMTSDMNGNKYTDRTKYPERVRI
alelo_8 YKIAKRNNYKNDQ--THPYEKDYHNPRLHKKFVTEATPIDMTSDMNGNKYTDRTKYPERVRI
alelo_20 YKIAKRNNYKNDQ--THPYEKDYHNPRLHKKFVTEATPIDMTSDMNGNKYTDRTKYPERVRI
alelo_3 YQIVKRNNYKPG----PYDGDYHMPRLHKKFVTESEPIGMTQLMDGSKYADLNKYDPRVRI
alelo_6 YQIVKRNNYKPDQ--KHHYNGDYHMPRLHKKFVTESSPFDMTGSMMKQTYADKEKYPMRVRI
alelo_19 YQIVKRNNYKPDQ--KHHYNGDYHMPRLHKKFVTESSPFDMTGSMMKQTYADKEKYPMRVRI
alelo_5 YQIVKRNNYKPKD--DNPYHGDYHMPRLHKKFVTDAPVEMTGNMNGAVYADRNKYPERVRI
alelo_32 YKIVKRNNYHND--KHRYLDDYHNPRLHKKFVTDAPIDMTSHMDGKNYANKEKYPERVRI
alelo_10 YQIVKRNNYKPG----QYDGDYHMPRLHKKFVTEIVPAEMTSHMDGRKYADLNKYDPRVRI
alelo_26 YQIAKRNNYKPG----QYDGDYHMPRLHKKFVTEIVPAEMTSHMDGRKYADLNKYDPRVRI
alelo_4 YQIVKRNNYKPGK--DNPYHGDYHMPRLHKKFVTDAPAKMTDNMNGKNYADLSKYDPRVRI
alelo_12 YQIVKRNNYKPGK--DNPYHGDYHMPRLHKKFVTDAPAKMTDNMNGKNYADLSKYDPRVRI
alelo_11 YQIVKRNNYKPKD--DNPYHGDYHMPRLHKKFVTDAPAKMTDSMNGKNYADLSKYDPRVRI
alelo_33 YQIVKRNNYKPKD--DNPYHGDYHMPRLHKKFVTDAPAKMTDSMNGKNYADLSKYDPRVRI
alelo_16 YQIVKRNNYKPKG--DNPYHGDYHMPRLHKKFVTDAPAKMTDNMNGKNYADLSKYDPRVRI
alelo_36 YQIVKRNNYKPKD--DNPYHGDYHMPRLHKKFVTDAPAKMTDSMNGKNYADLSKYDPRVRI
alelo_14 YQIVKRNNYKPKD--DNPYHGDYHMPRLHKKFVTDAPAKMTDNMNGKNYADLSKYDPRVRI
alelo_22 YQIVKRNNYKPKD--DNPYHGDYHMPRLHKKFVTDAPAKMTDSMNGKNYADLSKYDPRVRI
alelo_35 YQIVKRNNYKPKD--DNPYHGDYHMPRLHKKFVTDAPAKMTDSMNGKNYADLSKYDPRVRI
alelo_28 YQIVKRNNYKPKD--DNPYHGDYHMPRLHKKFVTDAPAKMTDNMNGKNYADLSKYDPRVRI
alelo_29 YQIVKRNNYKPKD--DNPYHGDYHMPRLHKKFVTDAPAKMTDNMNGKNYADLSKYDPRVRI
alelo_30 YQIVKRNNYKPKD--DNPYHGDYHMPRLHKKFVTDAPAKMTDNMNGKNYADLSKYDPRVRI
*:.** **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:

alelo_23 GSGHQYWKDDKNNNING-----DLAYGGAWLTGGNTFMDGSSNGVLYLNGRVQTPNKYGP
alelo_18 GSGHQYWKDDKNNNTKA-----DLAYGGAWLTGGNTFMDGGTGNGYLYLNGRVQTPNKYGP
alelo_17 GSGHQYWKDDKNNNTKA-----DLAYGGAWLTGGNTFMDGGTGNGYLYLNGRVQTPNKYGP
alelo_1 GSGHQYWKDDKNNNTKA-----DLAYGGAWLTGGNTFMDGGTGNGYLYLNGRVQTPNKYGP
alelo_24 GSGHQYWKDDKNNNTKA-----DLAYGGAWLTGGNTFMDGGTGNGYLYLNGRVQTPNKYGP
alelo_13 GSGHQYWKDDENNTKA-----DLAYGGAWLTGGNTFMDGGTGNGYLYLNGRVQTPNKYGP
alelo_9 GSGHQYWKDDNNKTIG-----DLAYGGSWLI GGNTFEDGPAGNGTLELNGRVQTPNKYGP
alelo_15 GSGHQYWKDDNNKTIG-----DLAYGGSWLI GGNTFEDGPAGNGTLELNGRVQTPNKYGP
alelo_2 GSGRQYWRDDKDEEKNLDSYVSGAYHYLTAGNTHQTSQNGNGTVNFSGNVVS PNHYGP
alelo_21 GSGRQYWHKKNNGP-----QGISGGYSYLIAGNTHNQVGGSDGHVSLNGDVVKEPNNYGP
alelo_27 GSGRQYWHKKNNGP-----QGISGGYSYLIAGNTHNQVGGSDGHVSLNGDVVKEPNNYGP
alelo_31 GSGDQYWRDDNDNR-----SGLSGAYKYL IAGNTHNQGRGTGGGWSLSGSDVRHLGNYGP
alelo_34 GSGDQYWRDDNDNR-----SGLSGAYKYL IAGNTHNQGRGTGGGWSLSGSDVRHLGNYGP
alelo_7 GSGWQFWRNDQNG-----DQVAGAYHYLTAGNTHNQGGAGGGWSLSGSDVRQAGNYGP
alelo_25 GSGWQFWRNDQNG-----DQVAGAYHYLTAGNTHNQGGAGGGWSLSGSDVRQAGNYGP
alelo_8 GSGWQFWRNDQNG-----DQVAGAYHYLTAGNTHNQGGAGGGWSLSGSDVRQAGNYGP
alelo_20 GSGWQFWRNDQNG-----DQVAGAYHYLTAGNTHNQGGAGGGWSLSGSDVRQAGNYGP
alelo_3 GSGKQWQRTDEQQANG--SDSSFLKDAYHHLIAGNTHIQGTGTGNGTVDLNGNLTKTNHYGP
alelo_6 GSGDQYWRNEQDK-----GTQVAEAYGYLIAGNTHMQTGAGNGDVSLSGDVRKGN DYGP
alelo_19 GSGDQYWRNEQDK-----GTQVAEAYGYLIAGNTHMQTGAGNGDVSLSGDVRKGN DYGP
alelo_5 GSGHHYWRYYDDDNHG-----DLAYSGHWLI GGNTHMQAGGWNNGVSLSGDVRHSNAYGP
alelo_32 GSGDQYWRDDQN-----NRTYLSDGYNLYLTGGNTYNQSGRGGDYSYVRGDIRKVG DYGP
alelo_10 GSGQWQWQRTDEQQA KGDAYS SWLAGAYNWR IAGNTHVQTGTGNGTVDLSGNLTKPNHYGP
alelo_26 GSGQWQWQRTDEQQA KGDAYS SWLAGAYNWR IAGNTHVQTGTGNGTVDLSGNLTKPNHYGP
alelo_4 GTGEQWWRTEDEEQKQG--SKSSWLADAYLWRIAGNTHS QSAGKGTVNLSGDI TKPNNYGP
alelo_12 GTGEQWWRTEDEEQKQG--SNSSWLADAYQWR IAGNTHSQRGAGNGTVNLSGDI TKPNNYGP
alelo_11 GTGEQWWRTEDEEQKQG--SKSSWLADAYLWRIAGNTHS QSAGKGTVNLSGDI TKPNNYGP
alelo_33 GTGEQWWRTEDEEQKQG--SKSSWLADAYLWRIAGNTHS QSAGKGTVNLSGDI TKPNNYGP
alelo_16 GTGEQWWRTEDEEQKQG--SNSSWLADAYLWRIAGNTHS QSAGAGNGTVNLSGDI TKPNNYGP
alelo_36 GTGEQWWRTEDEEQKQG--SKSSWLADAYLWRIAGNTHS QSAGAGNGTVNLSGDI TKPNNYGP
alelo_14 GTGEQWWRTEDEEQKQG--SKSSWLADAYLWRIAGNTYS QSAGKGTVNLSGDI TKPNNYGP
alelo_22 GTGEQWWRTEDEEQKQG--SKSSWLADAYLWRIAGNTHS QSAGAGNGTVNLSGDI TKPNNYGP
alelo_35 GTGEQWWRTEDEEQKQG--SKSSWLADAYLWRIAGNTHS QSAGAGNGTVNLSGDI TKPNNYGP
alelo_28 GTGEQWWRTEDEEQKQG--SKSSWLADAYQWRIAGNTHS QSAGKGTVNLSGDI TKPNNYGP
alelo_29 GTGEQWWRTEDEEQKQG--SKSSWLADAYQWRIAGNTHS QSAGKGTVNLSGDI TKPNNYGP
alelo_30 GTGEQWWRTEDEEQKQG--SKSSWLADAYLWRIAGNTYS QSAGKGTVNLSGDI TKPNNYGP
*:.** **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:. **:

alelo_23 LPIAGARGDSGSPFFVYDQIKKKWLLNGVLRREGHPYAGTGNAYQVARQEYL-EEVQTKDI
alelo_18 LPIAGAGDSGSPFLFIYDKKQEKWLLNGVLRREGHPPTAAVGNQYQIARKDYF-QEVFDNDM
alelo_17 LPIAGAGDSGSPFLFIYDKKQEKWLLNGVLRREGHPPTAAVGNQYQIARKDYF-QEVFDNDM
alelo_1 LPIAGAGDSGSPFLFIYDKKQEKWLLNGVLRREGHPPTAAVGNQYQIARKDYF-QEVFDNDM
alelo_24 LPIAGAGDSGSPFLFIYDKKQEKWLLNGVLRREGHPPTAAVGNQYQIARKDYF-QEVFDNDM
alelo_13 LPIAGAGDSGSPFFIYDKKQEKWLLNGVLRREGHPPTAAVGNQYQIARKDYF-QEVFDNDM
alelo_9 LPTAGSFGDSGSPMFIYDKKQEKWLLNGVLRREGNPTAAVGNQYQITRKDYF-QGILNQDI
alelo_15 LPTAGSFGDSGSPMFIYDKKQEKWLLNGVLRREGNPTAAVGNQYQITRKDYF-QGILNQDI
alelo_2 LPTGGSKGDSGSPMFIYDAKKEKWLINGVLQSGNPFVGRGNGFQLVREWEVYDEYAKDI
alelo_21 LPTGVSFGDSGSPMFIYDAKKEKWLINGVLREGNPEQGTHTNGYPIVRKAYL-TKIQDGD
alelo_27 LPTGVSFGDSGSPMFIYDATKQKWLINGVLREGNPTQGTHTNGYQVIRKDYL-TKILDGDT
alelo_31 LPVAGSSGDSGSPMFIYDKKQEKWLLNGVLRREGHPPTAAVGNQYQIARKDYF-QEVFDNDM
alelo_34 LPVAGSSGDSGSPMFIYDKKQEKWLLNGVLRREGHPPTAAVGNQYQIARKDYF-QEVFDNDM
alelo_7 IPIAGSSGDSGSPMFIYDAEKQKWLINGVLRTGNPWAGTENTFQLVRKSFF-DEILEKDL
alelo_25 IPIAGSSGDSGSPMFIYDAEKQKWLINGVLRTGNPWAGTENTFQLVRKSFF-DEILEKDL
alelo_8 IPIAGSSGDSGSPMFIYDAEKQKWLINGVLRTGNPWAGTENTFQLVRKSFF-DEILEKDL
alelo_20 IPIAGSSGDSGSPMFIYDAEKQKWLINGVLRTGNPWAGTENTFQLVRKSFF-DEILEKDL
alelo_3 LPTAGSFGDSGSPMFIYDAEQKQKWLINGVLRLGNPFLGAGNLFQLVRKDFYTSVFPNDT
alelo_6 MPTAGSFGDSGSPMFIYDAEQKQKWLINGVLRTGNPFLGAGNLFQLVRKDFYTSVFPNDT
alelo_19 MPTAGSFGDSGSPMFIYDAEQKQKWLINGVLRTGNPFLGAGNLFQLVRKDFYTSVFPNDT
alelo_5 IPIAGAGDSGSPMFIYDKENSKWLLNGVLTGYPSYSGRENSFQLVRKNWFYDKVYVYGD
alelo_32 LPIASSFGDSGSPMFIYDAEQKQKWLINGVLREGQPYTGEFDGFQLARKS-FLDEIRKQD
alelo_10 LPIAGSFGDSGSPMFIYDAEQKQKWLINGVLQSGNPFYLGAGNLFQLVRKDFYTSVFPNDT
alelo_26 LPIAGSFGDSGSPMFIYDAEQKQKWLINGVLQSGNPFYLGAGNLFQLVRKDFYTSVFPNDT
alelo_4 LPTGVSFGDSGSPMFIYDAIKQKWLINGVLQTNPFSGAGNGFQLIRKNWFYDNVFAEDL
alelo_12 LPTGVSFGDSGSPMFIYDAIKQKWLINGVLQTNPFSGAGNGFQLIRKNWFYDNVFAEDL
alelo_11 LPTGVSFGDSGSPMFIYDAIKQKWLINGVLQTNPFSGAGNGFQLIRKNWFYDNVFAEDL
alelo_33 LPTGVSFGDSGSPMFIYDAIKQKWLINGVLQTNPFSGAGNGFQLIRKNWFYDNVFAEDL
alelo_16 LPTGVSFGDSGSPMFIYDAIKQKWLINGVLQTNPFSGAGNGFQLIRKNWFYDNVFAEDL
alelo_36 LPTGVSFGDSGSPMFIYDAIKQKWLINGVLQTNPFSGAGNGFQLIRKNWFYDNVFAEDL
alelo_14 LPTGVSFGDSGSPMFIYDAIKQKWLINGVLQTNPFSGAGNGFQLIRKNWFYDNVFAEDL
alelo_22 LPTGVSFGDSGSPMFIYDAIKQKWLINGVLQTNPFSGAGNGFQLIRKNWFYDNVFAEDL
alelo_35 LPTGVSFGDSGSPMFIYDAIKQKWLINGVLQTNPFSGAGNGFQLIRKNWFYDNVFAEDL
alelo_28 LPTGVSFGDSGSPMFIYDAIKQKWLINGVLQTNPFSGAGNGFQLIRKNWFYDNVFAEDL
alelo_29 LPTGVSFGDSGSPMFIYDAIKQKWLINGVLQTNPFSGAGNGFQLIRKNWFYDNVFAEDL
alelo_30 LPTGVSFGDSGSPMFIYDAIKQKWLINGVLQTNPFSGAGNGFQLIRKNWFYDNVFAEDL
: * . : * * * * * : * * . * * : * * * * : * * . : : : * : : : :

alelo_23 TVSYLSH-----NANYALKTISDNGKITQ-----NDRISMDIGLYSNALPYDSR
alelo_18 AANFFDT-----NAEYTFKIGESHNGIVTTIQSSLVRAKQPPQTVGLYDISKPYDLR
alelo_17 AANFFDT-----NAEYTFKIGESHNGIVTTIQSSLVRAKQPPQTVGLYDISKPYDLR
alelo_1 AANFFDT-----NAEYTFKIGESHNGIVTTIQSSLVRAKQPPQTVGLYDISKPYDLR
alelo_24 AANFFDT-----NAEYTFKIGESHNGIVTTIQSSLVRAKQPPQTVGLYDISKPYDLR
alelo_13 AANFFDT-----NAEYTFKIGESHNGIVTTIQSSLVRAKQPPQTVGLYDISKPYDLR
alelo_9 TANFWDT-----NAEYRFNIGSDHNGRVATIKSTLPKKAIQPERIVGLYDNSQLHADR
alelo_15 TANFWDT-----NAEYRFNIGSDHNGRVATIKSTLPKKAIQPERIVGLYDNSQLHADR
alelo_2 HTIFN-PR-----PKDRHYTFTDNKDGASVTAQDNK-----YRQIANYNLFPN-----
alelo_21 GASIQDQ-----VGGASYLWEAKELGKSTISQENN-----PKF-----
alelo_27 GASIQDI-----VGGASYQWEAKELGKSTISQEN-----PRF-----
alelo_31 HTSLYTR-----AGNGVYTISGNDNGQGSITQKSGIPSE-I-----KITLANMSLPL-----
alelo_34 HTSLYTR-----AGNGVYTISGNDNGQGSITQKSGIPSE-I-----KITLANMSLPL-----
alelo_7 RTSFYSP-----SGNGAYITIDKGDGSGIVKQQTGRPSE-V-----RIGLKDDKLP-----
alelo_25 RTSFYSP-----SGNGAYITIDKGDGSGIVKQQTGRPSE-V-----RIGLKDDKLP-----
alelo_8 RTSFYSP-----SGNGAYITIDKGDGSGIVKQQTGRPSE-V-----RIGLKDDKLP-----
alelo_20 RTSFYSP-----SGNGAYITIDKGDGSGIVKQQTGRPSE-V-----RIGLKDDKLP-----
alelo_3 KAYFFDPM-----QRPNKHYQFTYNGTGTVTKIEDSTS-----TTVRLFNPNLKE---
alelo_6 KTTIFDFRTPKNQONQHYTFHSKNDGSGTITSGAGKI-----YKVKLANYNLSM---
alelo_19 KTTIFDFRTPKNQONQHYTFHSKNDGSGTITSGAGKI-----YKVKLANYNLSM---
alelo_5 HTIFFEA-----HKNGHFIFTSNNNGTGTVIN--ENASN-PRLKIQTVOFLNASLQD---
alelo_32 PNGFLTP-----KNGVYTIKSDDGIQVVTISKIGK-----REIPLANNKLI---
alelo_10 KTYFFDR-----KPNKHYLFTYNGTGTVTKTEDSTS-----TTVKLFNPTLSE---
alelo_26 KTYFFDR-----KPNKHYLFTYNGTGTVTKTEDSTS-----TTVKLFNPTLSE---
alelo_4 PITFLEP-----RSNGHYSFTSNNNGTGTVTQTNEKVSMPQFKVRTVQLFNEALKE---
alelo_12 PITFLEP-----RSNGHYSFTSNNNGTGTVTQTNEKVSMPQFKVRTVQLFNEALKE---
alelo_11 PITFLEP-----RSNGHYSFTSNNNGTGTVTQTNEKVSMPQFKVRTVQLFNEALKE---
alelo_33 PITFLEP-----RSNGHYSFTSNNNGTGTVTQTNEKVSMPQFKVRTVQLFNEALKE---
alelo_16 PITFLEP-----RSNGHYSFTSNNNGTGTVTQTNEKVSMPQFKVRTVQLFNEALKE---
alelo_36 PITFLEP-----RSNGHYSFTSNNNGTGTVTQTNEKVSMPQFKVRTVQLFNEALKE---
alelo_14 PITFLEP-----RSNGHYSFTSNNNGTGTVTQTNEKVSMPQFKVRTVQLFNEALKE---
alelo_22 PITFLEP-----RSNGHYSFTSNNNGTGTVTQTNEKVSMPQFKVRTVQLFNEALKE---
alelo_35 PITFLEP-----RSNGHYSFTSNNNGTGTVTQTNEKVSMPQFKVRTVQLFNEALKE---
alelo_28 PITFLEP-----RSNGHYSFTSNNNGTGTVTQTNEKVSMPQFKVRTVQLFNEALKE---
alelo_29 PITFLEP-----RSNGHYSFTSNNNGTGTVTQTNEKVSMPQFKVRTVQLFNEALKE---
alelo_30 PITFLEP-----RSNGHYSFTSNNNGTGTVTQTNEKVSMPQFKVRTVQLFNEALKE---
. : . :

alelo_23 GGKNGDISPDYKGNPWPSPALHNGKTMYLGD---GKGLTIENNINQAGAGGIYFEGDFV
alelo_18 GGKNGDESPSYKGNPWPSPALHHGKSIYFGDQ---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFV
alelo_17 GGKNGDESPSYKGNPWPSPALHHGKSIYFGDQ---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFV
alelo_1 GGKNGDESPSYKGNPWPSPALHHGKSIYFGDQ---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFV
alelo_24 GGKNGDESPSYKGNPWPSPALHHGKSIYFGDQ---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFV
alelo_13 GGKNGDESPTYKGNPWPSPALHHGKSIYFGDQ---GKGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFV
alelo_9 D-KNGDESPSYKGNPWPSPALHHGKSIYFGDQ---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFV
alelo_15 D-KNGDESPSYKGNPWPSPALHHGKSIYFGDQ---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFV
alelo_2 --YDGNYYSPALSNKNI AFIDK---GNGTITLTSIDIQAGAGGLYFEGDFI
alelo_21 SQMSDIANPSLQKQNYTPSLDHGKHITFGEYVEGGVGLTLKSNIDQAGAGGLYFEGDFI
alelo_27 SKMSDIANPSLLKQDKYTPSLDHGKHITFGEYVEGGVGLTLKSNIDQAGAGGLYFEGDFI
alelo_31 KDKDEVHNPSTYNGPNISYPRLNNGETLYFMDQ---KQGLIFASDINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_34 KDKDEVHNPSTYNGPNISYPRLNNGETLYFMDQ---KQGLIFASDINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_7 EGKDDVY--QYQGNIIYLPRLNNGNLYFGDQ---KNGTVTLSTNINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_25 EGKDDVY--QYQGNIIYLPRLNNGNLYFGDQ---KNGTVTLSTNINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_8 EGKDDVY--QYQGNIIYLPRLNNGNLYFGDQ---KNGTVTLSTNINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_20 EGKDDVY--QYQGNIIYLPRLNNGNLYFGDQ---KNGTVTLSTNINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_3 RGVEKVYTT--NGGNFYKPLDNGESLSFIDQ---GKGLIFTNSINQAGAGGLYFEGDFI
alelo_6 RGVEKVYTT--NGGNFYKPLDNGESLSFIDQ---GKGLIFTNSINQAGAGGLYFEGDFI
alelo_19 KGTEPVYTT--NGGVNYSPALSHGENLYFIDY---GKGLVTLFNSNIDQAGAGGLYFEGDFI
alelo_5 KGTEPVYTT--NGGVNYSPALSHGENLYFIDY---GKGLVTLFNSNIDQAGAGGLYFEGDFI
alelo_32 EDKDTVYNNRYNGPNISYQPLNNGKNIYFGDE---ELGSITLTTDIDQAGAGGLYFEGDFI
alelo_10 RGVEKVYTT--RGGNNFYKPLDNGESLSFIDQ---GKGLIFTNSVQAGAGGLYFEGDFI
alelo_26 RGVEKVYTT--RGGNNFYKPLDNGESLSFIDQ---GKGLIFTNSVQAGAGGLYFEGDFI
alelo_4 KDKEPVYA--AGGVNAYKPRLNNGKNIYFGDR---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_12 KDKEPVYA--AGGVNAYKPRLNNGKNIYFGDR---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGDFI
alelo_11 KDKEPVYA--AGGVNAYKPRLNNGKSIYFGDR---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_33 KDKEPVYA--AGGVNAYKPRLNNGKSIYFGDR---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_16 EDKPEVYA--AGGVNAYKPRLNNGKSIYFGDR---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_36 KDKEPVYA--AGGVNAYKPRLNNGKNIYFGDR---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGDFI
alelo_14 EDKPEVYA--AGGVNAYKPRLNNGKSIYFGDR---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_22 KDKEPVYA--AGGVNAYKPRLNNGKSIYFGDR---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_35 KDKEPVYA--AGGVNAYKPRLNNGKSIYFGDR---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_28 EDKPEVYA--AGGVNAYKPRLNNGKSIYFGDR---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_29 EDKPEVYA--AGGVNAYKPRLNNGKSIYFGDR---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFT
alelo_30 EDKPEVYA--AGGVNAYKPRLNNGKSIYFGDR---GTGLTIENNINQAGAGGLYFEGNFT
. : * * . : : * : : . : * * * * * : * * * * *

alelo_23 VKPRENNVTWQAGAGVSI GEYATVEWVKVKNPKGDRLSKIGVGTLLVNGIGENLGSISVGN
alelo_18 VKGSQNNITWQAGAGVSIQDATVEWVKVHNPENDRLSKIGTGLLVNGKGNLGSLSAGNG
alelo_17 VKGSQNNITWQAGAGVSIQDATVEWVKVHNPENDRLSKIGTGLLVNGKGNLGSLSAGNG
alelo_1 VKGSQNNITWQAGAGVSIQDATVEWVKVHNPENDRLSKIGTGLLVNGKGNLGSLSAGNG
alelo_24 VKGSQNNITWQAGAGVSIQDATVEWVKVHNPENDRLSKIGTGLLVNGKGNLGSLSAGNG
alelo_13 VKGSQNNITWQAGAGVSVGEESTVEWQVHNPEGDRLSKIGLGTLLVNGKGNLGSLSVGN
alelo_9 VKGNQNNITWQAGAGVSVGEESTVEWQVHNPEGDRLSKIGLGTLLVNGKGNLGSLSVGN
alelo_15 VKGNQNNITWQAGAGVSVGEESTVEWQVHNPEGDRLSKIGLGTLLVNGKGNLGSLSVGN
alelo_2 VSPT-HNETWKGAGISISDESTVIWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_21 VSPT-HNETWKGAGISISDESTVIWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_27 VSPT-QNETWKGAGISISDESTVIWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_31 VSPT-SNETWQAGAGVHVSSENSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_34 VSPT-SNETWQAGAGVHVSSENSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_7 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_25 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_8 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_20 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_3 VSTANPNDTWQAGAGISISEDSTVTWKVKNPKGDRLSKIGLGTLLVNGKGNLGSLSVGN
alelo_6 VSPT-HNETWKGAGISISDESTVIWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_19 VSPT-HNETWKGAGISISDESTVIWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_5 VSSE-NNATWQAGAGVHISEDSTVTWKVNGVYRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_32 VSPT-HNETWKGAGIHVSEISTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_10 VSTANPNDIQQAGAGISISEDSTVTWKVKNPEGDRLSKIGLGTLLVNGTGKNLGNISVGN
alelo_26 VSTANPNDIQQAGAGISISEDSTVTWKVKNPEGDRLSKIGLGTLLVNGTGKNLGNISVGN
alelo_4 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVYRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_12 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_11 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_33 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_16 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_36 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_14 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_22 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_35 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_28 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVEHDLRSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_29 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVEHDLRSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
alelo_30 VSSE-NNATWQAGAGVHVGEDSTVTWKVNGVENDRLSKIGKGLTHVQKGENKGSISVGDG
* . * * * * : : * * * * : * * * * * * * * * * *

alelo_23 TVILDQKADDDGNKQAFKEVGI VSGRGIVKLSADQVDPNNIYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_18 RVILDQQADEAGQKQAFKEVGI VSGRATVQLNSADQVDPNNIYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_17 RVILDQQADEAGQKQAFKEVGI VSGRATVQLNSADQVDPNNIYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_1 RVILDQQADEAGQKQAFKEVGI VSGRATVQLNSADQVDPNNIYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_24 RVILDQQADEAGQKQAFKEVGI VSGRATVQLNSADQVDPNNIYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_13 LVVLDQQADESGQKQAFKEVGI VSGRATVQLNSADQVDPNNIYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_9 LVVLDQQADESGQKQAFKEVGI VSGRATVQLNSADQVDPNNIYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_15 LVVLDQQADESGQKQAFKEVGI VSGRATVQLNSADQVDPNNIYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_2 TVILDQQADESGQKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_21 KVILEQQADDQNKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_27 KVILEQOTDDQKKQAFNEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_31 KVILDQQADENNQKQAFKEVGI VSGRATVQLNSEQVDPNNIYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_34 KVILDQQADENNQKQAFKEVGI VSGRATVQLNSEQVDPNNIYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_7 KVILDQQADDQKKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_25 KVILDQQADDQKKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_8 KVILDQQADDQKKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_20 KVILDQQADDQNKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_3 VVILEQEADENGQKQAFNEI GLVSGRGTVQLNGDNQFNPDKLYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_6 KVILEQQEDDQKKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_19 KVILEQQADDQNKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_5 KVILDQQADDQKKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_32 KVILDQQADDQKKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_10 TVILDQKADNDGKKQAFKEVGI VSGRATVQLNSADQVDPNNIYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_26 TVILDQKADNDGKKQAFKEVGI VSGRATVQLNSADQVDPNNIYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_4 KVILEQQADDQGNKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_12 KVILEQQADDQGNKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_11 KVILDQQADDQKKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_33 KVILDQQADDQKKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_16 KVILEQQADDQNKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_36 KVILEQQADDQKKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_14 KVILEQQADDQKKQAFKEVGI VSGRATVQLNSADQVDPNNIYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_22 KVILDQQADDQKKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_35 KVILDQQADDQKKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_28 KVILEQQADDQNKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_29 KVILEQQADDQNKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
alelo_30 KVILDQQADDQKKQAFSEI GLVSGRGTVQLNDDKQFDTDKFYFGFRGGRLDLNGHSLTF
.:: * : *****:*.**:****. *:*. .*. : :.:***** ***** .***

alelo_23 TRIQNTDEGAMIVNHNTNKESNITITGSNTIN----DKESDLTNKRDI AFNGWFGDKDD
alelo_18 KRIQNTDEGAMIVNHNTTESTVTITGSDTIN----NNTGDLTNKRDI AFNGWFGDKDD
alelo_17 KRIQNTDEGAMIVNHNTTESTVTITGSDTIN----NNTGDLTNKRDI AFNGWFGDKDD
alelo_1 KRIQNTDEGAMIVNHNTTESTVTITGSDTIN----NNTGDLTNKRDI AFNGWFGDKDD
alelo_24 KRIQNTDEGAMIVNHNTTESTVTITGSDTIN----NNTGDLTNKRDI AFNGWFGDKDD
alelo_13 ERIQNTDEGAMIVNHNASQTANITITGNATIN----SDSKQLTNKKDI AFNGWFGQDK
alelo_9 ERIQNTDEGAMIVNHNASQTANITITGNATIN----SDSKQLTNKKDI AFNGWFGQDK
alelo_15 ERIQNTDEGAMIVNHNASQTANITITGNATIN----SDSKQLTNKKDI AFNGWFGQDK
alelo_2 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQAAANITITGYDTIN----DDLKQLTNKRDI AFNGWFGETDE
alelo_21 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANVTITGNESIVLPN-GNNINKLNYSKYIAFNGWFGETDK
alelo_27 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANVTITGNESIVLPN-GNNINKLNYSKYIAFNGWFGETDK
alelo_31 KRIQNTDEGAMIVNHNTTESTVTITGSNTIN----NNTGDLTNKRDI AFNGWFGDKDD
alelo_34 KRIQNTDEGAMIVNHNTTESTVTITGSNTIN----NNTGDLTNKRDI AFNGWFGDKDD
alelo_7 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANITITGNESIAPTTKKNINKLDYSKEIAYNGWFGETDE
alelo_25 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANITITGNESIAPTTKKNINKLDYSKEIAYNGWFGETDE
alelo_8 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANITITGNESITVPSNKNINKLDYSKEIAYNGWFGETDK
alelo_20 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANVTITGYDTIN----DDLKQLTNKRDI AFNGWFGETDE
alelo_3 ERIQNTDEGAMIVNHNASQTANITITGNATINS----DSKQLTNKKDI AFNGWFGQDK
alelo_6 KRIQNTDEGAMIVNHNTTEVANVTITGNESIVLPN-GNNINKLNYSKYIAFNGWFGETDE
alelo_19 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANVTITGNESIVLPN-GNNINKLNYSKYIAFNGWFGETDK
alelo_5 KRIQNTDEGAMIVNHNTTESTVTITGSNSIN----NTERDLTNKRDI AFNGWFGDKDD
alelo_32 KRIQNTDEGAMIVNHNTTESTVTITGSDTIN----DNTGDLTNKRDI AFNGWFGDKDD
alelo_10 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANITITGNESITAPSNKNNINKLDYSKEIAYNGWFGETDK
alelo_26 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANITITGNESITAPSNKNNINKLDYSKEIAYNGWFGETDK
alelo_4 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQAAANVTITGNESIVLPN-GNNINKLDYRKEIAYNGWFGETDK
alelo_12 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQAAANVTITGNESIVLPN-GNNINKLNYSKYIAFNGWFGETDK
alelo_11 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANITITGNESITAPSNKNNINKLDYSKEIAYNGWFGETDE
alelo_33 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANITITGNESITAPSNKNNINKLDYSKEIAYNGWFGETDE
alelo_16 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANITITGNESIAPTTKKNINKLDYSKEIAYNGWFGETDK
alelo_36 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQAAANVTITGNESIVLPN-GNNINKLNYSKYIAFNGWFGETDE
alelo_14 KRIQNTDEGAMIVNHNTTESTVTITGSNSINNTTE----RDLTNKRDI AFNGWFGDKDD
alelo_22 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANITITGNESIAPTTKKNINKLDYSKEIAYNGWFGETDK
alelo_35 KRIQNTDEGAMIVNHNTTQVANITITGNESIAPTTKKNINKLDYSKEIAYNGWFGETDK
alelo_28 KRIQNTDEGAMIVNHNTTESTVTITGSNTIN----NNTGDLTNKRDI AFNGWFGDKDD
alelo_29 KRIQNTDEGAMIVNHNTTESTVTITGSNTIN----NNTGDLTNKRDI AFNGWFGDKDD
alelo_30 KRIQNTDEGAMIVNHNTTESTVTITGSDTIN----DNTGDLTNKRDI AFNGWFGDKDD
****.*****:*****: . :.:**** .* . * : **.*****: *

alelo_23 SRNIGRLNIHYSFNSDNHLLFSGGANLKNITQNGGNLILSGRPTPHAYNHLREDLSKR
alelo_18 TKNTGRLNVNYPNPKNDNHFLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNRP--NE
alelo_17 TKNTGRLNVNYPNPKNDNHFLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNRP--NE
alelo_1 TKNTGRLNVNYPNPKNDNHFLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNRP--NE
alelo_24 TKNTGRLNVNYPNPKNDNHFLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNRP--NE
alelo_13 AKTNGRLNVNYPVNAENHLLLSGGTNLNGNITQNGGTLVFSGRPTPHAYNHLRRDLSNM
alelo_9 AKTNGRLNVNYPVNAENHLLLSGGTNLNGNITQNGGTLVFSGRPTPHAYNHLRRDLSNM
alelo_15 AKTNGRLNVNYPVNAENHLLLSGGTNLNGNITQNGGTLVFSGRPTPHAYNHLRRDLSNM
alelo_2 NKHNGRLNLIYQPTAEDSTLLLSGGTNLNGDITQTKGKLFSSGRPTPHAYNHLNERWSKM
alelo_21 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKGDIQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNR--PNE
alelo_27 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKGDIQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLDR--PKD
alelo_31 TKNIGRLNVNYPNPKNDNHFLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNRP--NE
alelo_34 TKNIGRLNVNYPNPKNDNHFLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNRP--NE
alelo_7 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNRP--KD
alelo_25 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNRP--KD
alelo_8 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKGDIQTKGKLFSSGRPTPHAYNHLDRKRWSEM
alelo_20 NKHNGRLNLIYQPTAEDRTLLLSGGTNLNGDITQTKGKLFSSGRPTPHAYNHLDRKRWSEM
alelo_3 TKINGRLNVNYPVSADNRLLLSGGTNLKNITQNGGNLIVFSGRPTPHAYNHLNQKQSQA
alelo_6 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKGDIQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNRP--NE
alelo_19 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKGDIQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLRDKLSKL
alelo_5 TKNTGRLNVNYPNPKNDNHFLLSGGTNLKNITQERGTLVFSGRPTPHAYNHLNR--PNE
alelo_32 TKNTGRLNVNYPNPKNDNHFLLSGGTNLKNITQDGGTLVFSGRPTPHAYNHLNR--PNE
alelo_10 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKGDIQTKGKLFSSGRPTPHAYNHLDRKRWSEM
alelo_26 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKGDIQTKGKLFSSGRPTPHAYNHLDRKRWSEM
alelo_4 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKGDIQTKGKLFSSGRPTPHAYNHLNRKRWSEM
alelo_12 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKGDIQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNR--PNE
alelo_11 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNR--PNE
alelo_33 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNR--PNE
alelo_16 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNR--PNE
alelo_36 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKGDIQTKGKLFSSGRPTPHAYNHLDR--PKD
alelo_14 TKNTGRLNVNYPNPKNDNHFLLSGGTNLKNITQERGTLVFSGRPTPHAYNHLREDLSKK
alelo_22 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKGDIQAGGTLVFSGRPTPHAYNHLKDKLSKL
alelo_35 NKHNGRLNLIYKPTTEDRTLLLSGGTNLKGDIQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLRDKLSKL
alelo_28 TKNIGRLNVNYPNPKNDNHFLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNR--PNE
alelo_29 TKNIGRLNVNYPNPKNDNHFLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNR--PNE
alelo_30 TKNTGRLNVNYPNPKNDNHFLLSGGTNLKNITQEGGTLVFSGRPTPHAYNHLNR--PNE
: ****: *.* : :*:***:*:*:* ***.:***** . :

alelo_23 EGIPQGEIVWDHWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTISNNANATFGVVPNQ
alelo_18 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_17 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_1 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_24 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_13 EGIPQGEIVWDHWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_9 EGIPQGEIVWDHWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_15 EGIPQGEIVWDHWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_2 ENIPQGEIVWDHWINRTFKAENFYIQGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_21 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_27 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_31 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_34 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_7 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_25 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_8 EGIPQGEIVWDHWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_20 EGIPQGEIVWDHWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPKQ
alelo_3 EGLTPGEVVIDDDWINRTFKAENFYIQGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_6 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_19 EGIPQGEIVWDHWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_5 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIDGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_32 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFYIQGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_10 EGIPQGEIVWDYDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_26 EGIPQGEIVWDYDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_4 EGIPQGEIVWDHWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_12 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_11 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_33 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_16 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_36 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFYIQGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_14 EGIPQGEIVWDHWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_22 EGIPQGEIVWDYDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_35 EGIPQGEIVWDYDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
alelo_28 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGWTVSNANATFGVVPNQ
alelo_29 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGWTVSNANATFGVVPNQ
alelo_30 LGRPQGEVVIDDDWINRTFKAENFQIKGGSAVVSRNVSSIEGNWTVSNNANATFGVVPNQ
. **.* * ***:***** *.* ***:***** *.* ***:*****.*

alelo_23 QNTICTRSDWTGLTTCCKTENLTDTKVINSIPTTQINGSIDLTDSATANVKGLAKLNGNVT
alelo_18 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVNLTDDKVIDSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_17 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVNLTDDKVIDSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_1 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDTKVINSIPTTQINGSIDLTDNAIVNIHGLAKLNGNVT
alelo_24 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDTKVINSIPTTQINGSIDLTDNAIVNIHGLAKLNGNVT
alelo_13 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDKVIDSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_9 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDKVIDSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_15 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDKVIDSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_2 KNTICTRSDWTGLTTCCKTENLTDTKVINSIPTTQINGSINLTDNATANVKGLAKLNGNVT
alelo_21 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDTKVIDSIPTTQINGSINLTDSATANVKGLVNLNGNVT
alelo_27 QNTICTRSDWTGLTTCQSVNLTNPSVISSIPKTHINGDISLIDHARLNVNGLVYLNQTVN
alelo_31 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVNLTDDTKVINSIPTTQINGSINLTNNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_34 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVNLTDDTKVINSIPTTQINGSINLTNNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_7 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDTKVINSIPTTQINGSINLTDKATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_25 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDTKVINSIPTTQINGSINLTDKATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_8 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDTKVINSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_20 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVNLTDDKVIDSIPTTQINGSINLTNNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_3 KNTICTRSDWTGLTTCCKVLDLTDTKVINSIPTTQINGSINLTDNATANVKGLAKLNGNVT
alelo_6 QNTICTRSDWTGLTTCCKTENLTDTKVINSIPTTQINGSINLTDNATANVKGLAKLNGNVT
alelo_19 QNTICTRSDWTGLTTCQKVDLTDTKVINSIPTTQINGSINLTDNATANVKGLAKLNGNVT
alelo_5 QNTICTRSDWTGLTTECKSENLEQKTIIDSLPRTKVNQVHLMNSASAVASGLVDLIGNVT
alelo_32 QNTICTRSDWTGLTTCCKTENLTDTKVINSIPTTQINGSINLTDNATANVKGLAKLNGNVT
alelo_10 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVNLTDDKVIDSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_26 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVNLTDDKVIDSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_4 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDTKVINSIPTTQINGSINLTDKATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_12 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDTKVINSIPTTQINGSINLTNSATANVKGLVNLNGNVT
alelo_11 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVNLTDDKVIDSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_33 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVNLTDDKVIDSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_16 KNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDKVIDSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_36 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDTKVINSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_14 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDTKVINSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_22 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDTKVIDSIPTTQINGSINLTDSATANVKGLVNLNGNVT
alelo_35 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVDLTDDTKVINSIPTTQINGSINLTNNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_28 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVNLTDDKVIDSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_29 QNTICTRSDWTGLTTCCKTVNLTDDKVIDSIPTTQINGSINLTDNATVNIHGLAKLNGNVT
alelo_30 QNTICTRSDWTGLTTCQKVDLTDTKVINSIPTTQINGSINLTDNATANVKGLAKLNGNVT
:***** * : . : * : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

alelo_23 LIDHSQFTLSNNATQTGNIKLSNHANATV-----
alelo_18 LIDHSQFTLSNNATQIGNIKLSNHANATV-----
alelo_17 LIDHSQFTLSNNATQIGNIKLSNHANATV-----
alelo_1 LIDHSQFTLSNNATQIGNIKLSNHANATV-----
alelo_24 LIDHSQFTLSNNATQIGNIKLSNHANATV-----
alelo_13 LIDHSQFTLSNNATQTGNIKLSNHANATV-----
alelo_9 LIDHSQFTLSNNATQTGNIKLSNHANATV-----
alelo_15 LIDHSQFTLSNNATQTGNIKLSNHANATV-----
alelo_2 LTNHSQFTLSNNATQTGNIQLFDNANATV-----
alelo_21 LINH-----SQFTLSNNATQIGNIKL
alelo_27 AHSNSEYHLTDKATQIGNIKLSNNANATVNNATLTGNVTLNNSHFTLNNHATQTGNIQL
alelo_31 LIDHSQFTLSNNATQTGNIKLSNHANATVNNATLTGDVNLADTSRFTLSNQATQIGTISL
alelo_34 LIDHSQFTLSNNATQTGNIKLSNHANATVNNATLTGDVNLADTSRFTLSNQATQIGTISL
alelo_7 LINHSQFTLSNNATQIGNIQLSNHANAT-----
alelo_25 LINHSQFTLSNNATQIGNIQLSNHANAT-----
alelo_8 LIDHSQFTLSNNATQTGNIKLSNHANAT-----
alelo_20 LINHSQFTLSNNATQTGNIQLSNHANAT-----
alelo_3 LTNHSQFTLSNNATQIGNIRLSDNSTATV-----
alelo_6 LTNHSQFTLSNNATQIGNIRLSDNSTATV-----
alelo_19 LTNHSQFTLSNNATQIGNIRLSDNSTATV-----
alelo_5 LTQNSQFTLSNNATQTGSLVNOANATVNNATLTGDVNLADTSRFTLSNQATQIGTISL
alelo_32 LTNHSQFTLSNNATQIGNIKLSNHANATVDN-----
alelo_10 LINHSQFTLSNNATQIGNIKLSNHANARVNNATLMGDVNLADTSRFTLSNQATQIGTISL
alelo_26 LINHSQFTLSNNATQIGNIKLSNHANARVNNATLMGDVNLADTSRFTLSNQATQIGTISL
alelo_4 LINHSQFTLSNNATQIGNIQLSDNANATVDNATLNGVNLNMNOSHFTLSNQATQIGTISL
alelo_12 LIDHSQFTLSNNATQTGNIKLSNHANATV-----
alelo_11 LINHSRFTLSNNATQIGNIKLSNHANATV-----
alelo_33 LINHSRFTLSNNATQIGNIKLSNHANATV-----
alelo_16 LINHSQFTLSNNATQIGNIKLSDNANATV-----
alelo_36 LIDHSQFTLSNNATQIGNIKLSNHANATV-----
alelo_14 LIDHSQFTLSNNATQTGNIKLSNHANATVNNATLTGDVNLADTSRFTLSNQATQIGTISL
alelo_22 LINHSQFTLSNNATQTGNIKLSNHANA-----
alelo_35 LIDHSQFTLSNNATQIGNIKLSNHANARVNNATLMGDVNLADTSRFTLSNQATQIGTISL
alelo_28 LIDHSQFTLSNNATQIGNIKLSNHANARVNNATLMGDVNLADTSRFTLSNQATQIGTISL
alelo_29 LIDHSQFTLSNNATQIGNIKLSNHANARVNNATLMGDVNLADTSRFTLSNQATQIGTISL
alelo_30 LTNHSQFTLSNNATQIGNIKLSNHANATVDNATLTG-----
: :

alelo_23 -----DNANLNGNVNLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGGEGTTVTLENSTWTMPSDITLQ
alelo_18 -----DNATLNGNVNLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKGTTVTLENATWTMPSDITLH
alelo_17 -----DNATLNGNVNLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKGTTVTLENATWTMPSDATLQ
alelo_1 -----DNATLNGNVNLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDATLQ
alelo_24 -----DNATLNGNVNLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDATLQ
alelo_13 -----DNANLNGNVNLMDSAQFSLKNSHFHSHQIQGGEDTTVMLENATWTMPSDITLQ
alelo_9 -----DNANLNGNVNLMDSAQFSLKNSHFHSHQIQGGEDTTVMLENATWTMPSDITLQ
alelo_15 -----DNANLNGNVNLMDSAQFSLKNSHFHSHQIQGGEDTTVMLENATWTMPSDITLQ
alelo_2 -----DNATLNGNVNLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKGTTVMLENATWTMPSDITLH
alelo_21 SNHAKATVNNATLNGNVHLTDSARFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDATLQ
alelo_27 SDNANATVDNATLTGDNVLTDSAQFYLKNSHFHSHQIQGDKGTTVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_31 HQQAQATVDNANLNGNVHLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_34 HQQAQATVDNANLNGNVHLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_7 -----VDNANLNGNVNLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDATLQ
alelo_25 -----VDNANLNGNVNLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDATLQ
alelo_8 -----VDNATLNGNVNLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDEGTTVMLENATWTMPSDITLQ
alelo_20 -----VDNANLNGNVHLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_3 -----DNANLNGNVHLTDSAQFYLKNSHFHSHQIQGDKGTTVTLENSTWTMPSDITLQ
alelo_6 -----DNANLNGNVHLTNSAQFYLKNSHLSHQIQGDKGTTVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_19 -----DNANLNGNVHLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKGTTVMLENATWTMPSDITLQ
alelo_5 HQQAQATVDNANLNGNVNLTDSAQFYLKNSHFHSHQIQGDKGTTVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_32 -----ATLTGDNVLTDSAQFYLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_10 HQQAQATVDNANLNGNVHLTDSARFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_26 HQQAQATVDNANLNGNVHLTDSARFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_4 HQQAQATVDNANLNGNVNLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_12 -----NATLNGNVNLTDSARFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_11 -----DNATLNGNVHLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_33 -----DNATLNGNVHLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_16 -----DNANLNGNVHLTDSARFSLKNSHFHSHQIQGGEGTTVTLENATWTMPSDATLH
alelo_36 -----DNATLNGNVHLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_14 HQQAQATVDNANLNGNVHLTDSAQFYLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_22 -----TVDNANLNGNVNLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
alelo_35 HQQAQATVDNANLNGNVNLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGDKGTTVTLENSTWTMPSDITLQ
alelo_28 HQQAQATVDNANLNGNVHLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGGEGTTVTLENATWTMPSDATLQ
alelo_29 HQQAQATVDNANLNGNVHLTDSAQFSLKNSHFHSHQIQGGEGTTVTLENATWTMPSDATLQ
alelo_30 -----DVNLTDSAQFYLKNSHFHSHQIQGDKDITVTLENATWTMPSDITLQ
* * * : ** : * * * * : : * * * * * . : . * * * * * * * : * * * * * : * * :

alelo_23 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAPLRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_18 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETTPKSAEHRFNLTLVNGKLRGQGTFFQF
alelo_17 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_1 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLRGKGFQF
alelo_24 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_13 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_9 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_15 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_2 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_21 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_27 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_31 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_34 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_7 NLTLLNSTVTLNSAYLASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_25 NLTLLNSTVTLNSAYLASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_8 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLRGKGFQF
alelo_20 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_3 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETTPKSAEHRFNLTLVNGKLRGQGTFFQF
alelo_6 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_19 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_5 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_32 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_10 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_26 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_4 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLRGKGFQF
alelo_12 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_11 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_33 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_16 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_36 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_14 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLRGKGFQF
alelo_22 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLRGKGFQF
alelo_35 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_28 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_29 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRH-RRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
alelo_30 NLTLLNSTVTLNSAYSASSNNAAPRRRRSLETETPTSAEHRFNLTLVNGKLSGQGTFFQF
* * * * * : * * * * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * : * * * * *

alelo_23 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPVTLEQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_18 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGNYTLVRNTGKEPETLEQLTLIESLDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_17 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPEALEQLTLVESKDNQPLSDKLLKFTLEN
alelo_1 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPVTFGQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_24 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPEALEQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_13 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPVTFGQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_9 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPVTFGQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_15 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPVTFGQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_2 TSSLFGYKSDKLLKLSYDAEGDYTLVRNTGTEPVTLEQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_21 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPETLEQLTLVESLDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_27 TSSLFGYKSDKLLKLSKDAEGTYKLAVHNTGKEPVTLEQLTLIESLDNQPLSDKLLKFTLEN
alelo_31 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPEALEQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_34 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPEALEQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_7 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPEALEQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_25 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPEALEQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_8 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPVTFGQLTLVESKDNQPLSDKLLKFTLEN
alelo_20 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGTYKLAVSNTGKEPEILGQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_3 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGNYTLVRNTGKEPETLEQLTLIESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_6 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYILSVRNTGKEPETLEQLTLVESKDNQPLSDKLLKFTLEN
alelo_19 TSSLFGYKSDKLLKLSKDAEGTYKLAVRNTGKEPVTLEQLTLIESLDNQPLSDKLLKFTLEN
alelo_5 TSSLFGYKSDKLLKLSDDAEGDYILAVRDTGKEPKTLEHLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_32 TSSLFGYKSDKLLKLSKDAEGTYKLAVRNTGKEPVTLEQLTLIESLDNQPLSDKLLKFTLEN
alelo_10 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPVALEQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_26 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPVTLEQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_4 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPVTFGQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_12 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYILAVRDTGKEPETLGQLTLVESKDNQPLSDKLLKFTLEN
alelo_11 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGTYKLAVSNTGKEPKTLGQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_33 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGTYKLAVSNTGKEPETLGQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_16 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPVTLGQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_36 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPEALEQLTLVESKDNQPLSDKLLKFTLEN
alelo_14 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPEALEQLTLVESKDNQPLSDKLLKFTLEN
alelo_22 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPEALEQLTLVESKDNQPLSDKLLKFTLEN
alelo_35 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPETLGQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_28 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPVTLGQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_29 TSSLFGYKSDKLLKLSNDAEGDYTLVRNTGKEPVTLGQLTLVESKDNKPLSDKLLKFTLEN
alelo_30 TSSLFGYKSDKLLKLSKDAEGTYKLAVRNTGKEPVTLEQLTLIESLDNQPLSDKLLKFTLEN
*****.*:***** ** ** *:* :*.** : :***:** **:******.*****

alelo_23 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRSEQAERTLEAKQAEFTAETQQSEA
alelo_18 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQVEQTAETQTSKA
alelo_17 DHVDAGALRYKLVKNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQVEQTAKTQTSKA
alelo_1 DHVDAGALRYKLVKNDGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLE-----
alelo_24 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKLAELTDKKQKGEA
alelo_13 DHVDAGALRYKLVKNDGEFRLHNP I KEQELRSDLVRAEQAERTLEAKQVEQTAKTQTSKA
alelo_9 DHVDAGALRYKLVKNDGEFRLHNP I KEQELRSDLVRAEQAERTLEAKQVEQTAKTQTSKA
alelo_15 DHVDAGALRYKLVKNDGEFRLHNP I KEQELRSDLVRAEQAERTLEAKQVEQTAKTQTSKA
alelo_2 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRSEQAERTLEAKQAEVPTTQSSKA
alelo_21 DHVDAGALRYKLVKNDGEFRLHNP I KEQELRSDLVRAEQAERTLEAKQVEQTAETQTSNA
alelo_27 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELHNDLVKAEQTERTEAKQAEVMPRTQSPKA
alelo_31 DHVDAGALRYKLVKNDGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQA-LTAKTQKSEV
alelo_34 DHVDAGALRYKLVKNDGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQA-LTAKTQKSEV
alelo_7 DHVDAGALRYKLVKNDGEFRLHNP I KEQELRSDLVRAEQAERTLEAKQA-LTAEQTGTGEP
alelo_25 DHVDAGALRYKLVKNDGEFRLHNP I KEQELRSDLVRAEQAERTLEAKQA-LTAEQTGTGEP
alelo_8 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQAEVLTAKKQSEA
alelo_20 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQVEQTAETQQSEA
alelo_3 DHVDAGALRYKLVKNDGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQAEVLTAE-----
alelo_6 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELHNDLVRAEQAERTLEAKQVEPTAETQTSKA
alelo_19 DHVDAGALRYKLVKNDGEFRLHNP I KEQELHNDLVRAEQAERTLEAKQVEPTAETQTSKA
alelo_5 KHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELRNDLVKAEQTERTEAKQAEVMPRTQSPK-
alelo_32 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQVEPTAETQTSKA
alelo_10 DHVDAGALRYKLVKNGEFRLHNP I KEQELRSDLVRAEQAERTLEAKQVEQTAETQTSNA
alelo_26 DHVDAGALRYKLVKNGEFRLHNP I KEQELRSDLVRAEQAERTLEAKQVEQTAETQTSNA
alelo_4 DHVDAGALRYKLVKNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQVEPTAETQTSKA
alelo_12 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELHNDLVRAEQAERTLEAKQVEPTAETQTSKA
alelo_11 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQVEPTAETQTSKA
alelo_33 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQVEPTAETQTSKA
alelo_16 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQVEPTAETQTSNA
alelo_36 DHVDAGAWRYKLVKNGEFRLHNP I KEQELRSDLVRAEQAERTLEAKQVEQTAETQQSEA
alelo_14 DHVDAGALRYKLVKNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQAEVLTAKTGTGEP
alelo_22 DHVDAGALRYKLVKNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQAEVLTAKTGTGEP
alelo_35 DHVDAGALRYKLVKNDGEFRLHNP I KEQELRSDLVRAEQAERTLEAKQVEQTAETQTSNA
alelo_28 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQVEQTAETQQSEA
alelo_29 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELRNDLVRAEQAERTLEAKQVEQTAETQQSEA
alelo_30 DHVDAGALRYKLVKNNGEFRLHNP I KEQELHNDLVRAEQAERTLEAKQVEPTAETQTSKA
***** ** ** *:* :*.** : :***:** **:******.*****

```

alelo_23  KVRSKRA-----VFFDTLDPDQSQ
alelo_18  KVRSKRA-----VFPDTLPAQSL
alelo_17  RVRSRRA-----VFSDDLPAQSL
alelo_1   -----
alelo_24  KVRLRRA-----VLSDTPSAQSL
alelo_13  RVRSRRA-----VFSDDLPAQSL
alelo_9   RVRSRRA-----VFSDDLPAQSL
alelo_15  RVRSRRA-----VFSDDLPAQSL
alelo_2   KVRSRRAAFSD-TLPPDPQSQLNVLQA-----
alelo_21  RVRLRRA-----VLSDTPSAQSL
alelo_27  KVRSKRA-----AFSDTQPDQIP
alelo_31  KVRSKRA---LFFDTPSAQSQL-----
alelo_34  KVRSKRA---LFFDTPSAQSQL-----
alelo_7   KVRLRRA---VLSDFPSAQSLNNALEAKQAEFN-----
alelo_25  KVRLRRA---VLSDFPSAQSLNNALEAKQAEFN-----
alelo_8   KVRLRRA---VFSDDLPAQSQLNNALEAKQALTTETQTSKA-----
alelo_20  KVRLRRA---VLSDFPPAQSQLNNALEAKQAELEAKTQGTGKA-KARSRRAVFSDTPSAQSL
alelo_3   -----K-----
alelo_6   KVRLR---RAVLPDTLPAQSLNNALEAKQAEFNAKTQK-----
alelo_19  KVRSRRAARAAPDTPDQSQLNNALEAKQAELEAKTQK-----
alelo_5   -----
alelo_32  KVRSRRAARAAPDTPDQSQLNNALEAKQAL-TAEKQKSKA-----
alelo_10  RVRSRRA---VLSDTPSAQSLNNALE-----
alelo_26  RVRSRRA---VLSDTPSAQSLNNALE-----
alelo_4   KVRSRRAARAAPDTPDQSQLNNALEAKQAELEAKTQKSKAKT-----
alelo_12  KVRSRRAARAAPDTPDQSQLNNALEAKQAL-TAEKQKSKAKKG-----
alelo_11  KVRLRRA---VLSDDLPAQSQLNNALEAKQVEQT-----
alelo_33  KVRLRRA---VLSDDLPAQSQLNNALEAKQVEQT-----
alelo_16  RVRSKRA---AFSDTTPDQSQLNNALEAKQAEFNAKTQKSKAKKVRSKRAVSDTLPDQSQ
alelo_36  KVRLRRA---VLSDFPPAQSQLNVLQAKQVELTAEKQKSKP-----
alelo_14  KVRSRRA---VLSDTPSAQSLNVLEAKQVELTAEKQPSKA-K-----
alelo_22  KVRSRRA---VLSDTPSAQSLNVLEAKQVELTAEKQPSKA-K-----
alelo_35  RVRSRRA---VLSDTPSAQSLNNALEVKQAELEAKQKSKA-KARSRRAVLSDTPSAQSL
alelo_28  KVRLRRA---VLSDFPPAQSQLNNALEAKQAELEAKTQGTGKA-KVRLRRAVLSDDLPAQSL
alelo_29  KVRLRRA---VLSDFPPAQSQLNNALEAKQAELEAKTQGTGKA-KVRLRRAVLSDDLPAQSL
alelo_30  KVRSRRA-----ARAAFPDTPDQSL

```

→ A partir de este punto se elimina el alelo 2 del alineamiento

```

alelo_23  VRSKRA-----VFFDTLDPDQSQL
alelo_18  VRSKRA-----VFPDTLPAQSL
alelo_17  VRSRRA-----VFSDDLPAQSL
alelo_1   -----
alelo_24  VRLRRA-----VLSDTPSAQSL
alelo_13  VRSRRA-----VFSDDLPAQSL
alelo_9   VRSRRA-----VFSDDLPAQSL
alelo_15  VRSRRA-----VFSDDLPAQSL
alelo_21  VRLRRA-----VLSDTPSAQSL
alelo_27  VRSKRA-----AFSDTQPDQIP
alelo_31  VRSKRA---LFFDTPSAQSQL-----
alelo_34  VRSKRA---LFFDTPSAQSQL-----
alelo_7   VRLRRA---VLSDFPSAQSLNNALEAKQAEFN-----
alelo_25  VRLRRA---VLSDFPSAQSLNNALEAKQAEFN-----
alelo_8   VRLRRA---VFSDDLPAQSQLNNALEAKQALTTETQTSKA-----
alelo_20  VRLRRA---VLSDFPPAQSQLNNALEAKQAELEAKTQGTGKA-KARSRRAVFSDTPSAQSL
alelo_3   -----K-----
alelo_6   VRLR---RAVLPDTLPAQSLNNALEAKQAEFNAKTQK-----
alelo_19  VRSRRAARAAPDTPDQSQLNNALEAKQAELEAKTQK-----
alelo_5   -----
alelo_32  VRSRRAARAAPDTPDQSQLNNALEAKQAL-TAEKQKSKA-----
alelo_10  VRSRRA---VLSDTPSAQSLNNALE-----
alelo_26  VRSRRA---VLSDTPSAQSLNNALE-----
alelo_4   VRSRRAARAAPDTPDQSQLNNALEAKQAELEAKTQKSKAKT-----
alelo_12  VRSRRAARAAPDTPDQSQLNNALEAKQAL-TAEKQKSKAKKG-----
alelo_11  VRLRRA---VLSDDLPAQSQLNNALEAKQVEQT-----
alelo_33  VRLRRA---VLSDDLPAQSQLNNALEAKQVEQT-----
alelo_16  VRSKRA---AFSDTTPDQSQLNNALEAKQAEFNAKTQKSKAKKVRSKRAVSDTLPDQSQL
alelo_36  VRLRRA---VLSDFPPAQSQLNVLQAKQVELTAEKQKSKP-----
alelo_14  VRSRRA---VLSDTPSAQSLNVLEAKQVELTAEKQPSKA-K-----
alelo_22  VRSRRA---VLSDTPSAQSLNVLEAKQVELTAEKQPSKA-K-----
alelo_35  VRSRRA---VLSDTPSAQSLNNALEVKQAELEAKQKSKA-KARSRRAVLSDTPSAQSL
alelo_28  VRLRRA---VLSDFPPAQSQLNNALEAKQAELEAKTQGTGKA-KVRLRRAVLSDDLPAQSL
alelo_29  VRLRRA---VLSDFPPAQSQLNNALEAKQAELEAKTQGTGKA-KVRLRRAVLSDDLPAQSL
alelo_30  VRSRRA-----ARAAFPDTPDQSL

```

alelo_23 NVLQAKQVEPTAKIQ---TGEPKVRSRRATRAAFDPTPLDLSQL-KVLQVKLEAINVQQQ
alelo_18 NALEAKQALTAEKQK---SKAKKGRSK---RAVFSDDPLDSL---FALEAALEVIYAPQQ
alelo_17 NALEAKQALTTETQ---TSKAKKVRSKRAARE-FSDTLPD-----QILQAALEVIDAQQQ
alelo_1 ---AKQVEQTAEKQPSKAKTKKVRSKRALREAFSDTLLDQSLLNALVEVKLEINAQPPQ
alelo_24 NVLEAKQVELTAEKQPSKAKTKKVRSKRALREAFSDTLLDLSQLK-VLEVKLEINAQSQ
alelo_13 NALEAKQALTTETQ---SKAKKVRSKRAAR-EFSDPLPD-----QILQAALEVIDAQQQ
alelo_9 KALEAKQALTTETQ---SKAKKVRSKRAAR-EFSDTLPD-----QILQAALEVIDAQQQ
alelo_15 NALEAKQALTTETQ---SKAKKVRSKRAAR-EFSDTLPD-----QILQAALEVIDAQQQ
alelo_21 NALEAKQVEQTETQTSKPKTKKGRSKRALSAAFSDTPLDQSLLNALVEVKLEINAQPPQ
alelo_27 NALEA-----ALEVIDAQQQ
alelo_31 NALEAKQVEPTAETRTSKPKTKKVRRLRALREAFSDTLPDLSQL-KVLQVKLEINAQPPQ
alelo_34 NALEAKQVEPTAETRTSKPKTKKVRRLRALREAFSDTLPDLSQL-KVLQVKLEINAQPPQ
alelo_7 -----AKTKKSKAKTKKARSKRALSAAFSDDTLPDLSQL-KVFEVKLEINAQPPQ
alelo_25 -----AKTKKSKAKTKKARSKRALSAAFSDDTLPDLSQL-KVFEVKLEINAQPPQ
alelo_8 -----KVKRSKRA-AREFSDDTLLDLSQL-QVLEVKLEINAQSQ
alelo_20 NVLEAKQVELTAEKQPSKAKTKKARSKRALSAAFSDDTLPDQSLLNALVEVKLEINAVQQQ
alelo_3 -----QKSKAKKVRSKRALREAFSDPPPQSQLDV-LKAALEVINAPPPQ
alelo_6 -----SKAKTKKARSKRALSAAFSDDPPPQSQLDV-LKAALEVINAPPPQ
alelo_19 -----SKAKTKKVRSKR---AVFSDDPLDS--LFA-LEAALEVIDAPQK
alelo_5 -----AKARSKRALRAFSDTLPDLSQLNA-LEAALEVINAPPPQ
alelo_32 -----KVKRS---KRAAFSDTLPDISQLKV-LQVKLEINAQPPQ
alelo_10 ----VKQAEPNAKTKKSKAKTKKARSKRALSAAFSDDTLPDLSQLNV-LEAALEVINAPPPQ
alelo_26 ----VKQAEPNAKTKKSKAKTKKARSKRALSAAFSDDTLPDLSQLNV-LEAALEVINAPPPQ
alelo_4 -----KVKRSK---RAVFSDDPLDQSL--FALEAALEVIDAPPPQ
alelo_12 -----RSKRA-ARAFSDTLPDLSQ---KVLEVKLEINAQPPQ
alelo_11 -----AETQTSKPKTKKVRSKRALREAFSDTLPDLSLLNALVEVKLEINAVQQQ
alelo_33 -----AETQTSKPKTKKVRSKRALREAFSDTLPDLSLLNALVEVKLEINAVQQQ
alelo_16 DVLQAEQVEPTAEKQPSK---KVRSRRALREAFDPTLPAQSQNLV-LQAALEVIDAQQQ
alelo_36 -----KVRSRRALREAFSDTLPDLSQLKV-LEVKLEINAQPPQ
alelo_14 -----TKKVRSKRALREAFSDTLLDLSQLKV-LEVKLEINAQSQ
alelo_22 -----TKKVRSKRALREAFSDTLLDLSQLKV-LEVKLEINAQSQ
alelo_35 NALEAKQVEQTETQTSKPKTKKVRSK---RALFFDTPDQSQLDV-LKAALEVINAPPPQ
alelo_28 NALEAKQVEPTAKTQKS--KAKKARSKRALSAAFSDDTLPDQIL-QA----ALEVIDAQQQ
alelo_29 NALEAKQVEPTAKTQKS--KAKKARSKRALSAAFSDDTLPDQIL-QA----ALEVIDAQQQ
alelo_30 NALAKQALT--AEKQKS--KAKKV---RSKRAAFSDTLPDQIL-LNALEAALEVIDAQQQ

**.*

alelo_23 TEKERQAQEEAAKRQKQKELISRYNSALSSELSATVNSMLSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_18 SEKDRLAQE-EAEKQRKQKDLISRYNSALSSELSATVNSMLSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_17 VKKEPQTQEEEEKRQKQKELISRYNSALSSELSATVNSMLSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_1 VKKEPQAQEEQEKIQGKQKELISRYNSALSSELSATVNSMLSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_24 AEKERQAQEEAAKRQKQKELISRYNSALSSELSATVNSMLSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_13 VKKEPQTQEEEEKRQKQKELISRYNSALSSELSATVNSMLSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_9 VKKEPQTQEEEEKRQKQKELISRYNSALSSELSATVNSMLSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_15 VKKEPQTQEEEEKRQKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_21 AGKERQAQE---KQGKQKDLISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_27 ----VAQ---AVQNQKDLISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_31 VKKEPQTQEEQEKIQGKQKELISRYNSALSSELSATVNSMLSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_34 VKKEPQTQEEQEKIQGKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_7 VKKEPQDQEE---QGGKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_25 VKKEPQDQEE---QGGKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_8 AGKERQTQEEQEKIQGKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_20 VKKEPQDQEEQEKIQGKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_3 VGKERQAQE---KQGKQKDLISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_6 VGKERQA---QEKQGKQKDLISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_19 SEKDRLAQEE-AEKQRKQKDLISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_5 SEKDRQAQEEAAKRQKQKDLISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_32 VKKEPQAQEEQEKIQGKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_10 TEKERQAQEEAAKRQKQKDLISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_26 TEKERQAQEEAAKRQKQKDLISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_4 SEKDRLAQEE-AEKQRKQKDLISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_12 VGKERQTQEEQEKIKRQKQKDLISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_11 VGKERQTQEEQEKIQGKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_33 VGKERQTQEEQEKIQGKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_16 VKKEPQTQEEQEKIQGKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_36 VKKEPQAQEEQEKIQGKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_14 AEKERQAQEEAAKRQKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_22 AEKERQAQEEAAKRQKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_35 VGKERQTQEEEEKRQKQKELISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_28 VKKEPQTQEEEEKRQKQKDLISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_29 VKKEPQTQEEEEKRQKQKDLISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW
alelo_30 EK-E-RLAQEEAERQKQKDLISRYNSALSSELSATVNSMFSVQDELDRFLVFDQAQSAVW

:*:*:*****:*****:*

alelo_23	LGYRW
alelo_18	LGYRW
alelo_17	LGYRW
alelo_1	LGYRW
alelo_24	LGYRW
alelo_13	LGYRW
alelo_9	LGYRW
alelo_15	LGYRW
alelo_21	LGYRW
alelo_27	LGYRW
alelo_31	LGYRW
alelo_34	LGYRW
alelo_7	LGYRW
alelo_25	LGYRW
alelo_8	LGYRW
alelo_20	LGYRW
alelo_3	LGYRW
alelo_6	LGYRW
alelo_19	LGYRW
alelo_5	LGYRW
alelo_32	LGYRW
alelo_10	LGYRW
alelo_26	LGYRW
alelo_4	LGYRW
alelo_12	LGYRW
alelo_11	LGYRW
alelo_33	LGYRW
alelo_16	LGYRW
alelo_36	LGYRW
alelo_14	LGYRW
alelo_22	LGYRW
alelo_35	LGYRW
alelo_28	LGYRW
alelo_29	LGYRW
alelo_30	LGYRW

Tabla C1. Distribución alélica de Hap en la colección de aislados clínicos según grupo clonal. Reordenación por grupos clonales de la **Tabla 9** (Resultados).

Grupo clonal	Cepa	Paciente	Alelo Hap	Longitud de la proteína (aa)	Peso molecular predicho (kDa)
1	P588	1	1	1362	150,98719
	P604	5	1	1362	150,98719
	P605	5	1	1362	150,98719
	P641	10	1	1362	150,98719
	P642	10	1	1362	150,98719
2	P589	1	2	1041	115,58492
	P590	1	2	1041	115,58492
3	P591	1	3	1351	150,18607
4	P592	1	4	1443	160,20538
5	P593	2	5	1391	154,69819
6	P594	2	6	1392	154,54797
	P595	2	6	1392	154,54797
	P596	2	6	1392	154,54797
	P650	10	6	1392	154,54797
7	P597	2	7	1388	153,75774
8	P598	4	8	1392	154,91834
	P631	8	8	1392	154,91834
	P662	12	9	1391	154,84534
	P663	12	9	1391	154,84534
9	P599	4	10	1438	159,75668
	P609	5	10	1438	159,75668
	P651	10	10	1438	159,75668
	P652	10	10	1438	159,75668
	P653	10	10	1438	159,75668
	P654	10	10	1438	159,75668
10	P600	4	11	1390	154,33383
	P601	4	11	1390	154,33383
	P602	4	11	1390	154,33383
	P612	6	11	1390	154,33383
	P613	6	11	1390	154,33383
	P614	6	11	1390	154,33383
	P615	6	11	1390	154,33383
	P616	6	11	1390	154,33383
	P618	6	11	1390	154,33383
	P620	7	11	1390	154,33383
	P621	7	11	1390	154,33383
	P622	7	11	1390	154,33383
	P623	7	11	1390	154,33383
	P624	7	11	1390	154,33383
	P629	8	11	1390	154,33383
P632	8	11	1390	154,33383	
P633	8	11	1390	154,33383	
11	P603	5	12	1402	155,60096
12	P606	5	13	1394	154,90051
13	P607	5	14	1441	160,05291
	P608	5	14	1441	160,05291
14	P610	6	15	1391	154,83127
15	P611	6	16	1440	159,83182
16	P617	6	17	1391	154,37393
	P634	9	17	1391	154,37393
	P635	9	17	1391	154,37393
	P636	9	17	1391	154,37393
	P637	9	17	1391	154,37393
	P667	13	18	1391	154,22296
	P668	13	18	1391	154,22296
	P669	13	18	1391	154,22296
	P676	14	19	1395	155,15708
	P679	14	19	1395	155,15708
	P853	14	19	1395	155,15708
17	P638	10	20	1429	158,9665
18	P625	7	21	1381	153,00998
	P673	13	21	1381	153,00998
19	P626	7	22	1407	156,34517

Grupo clonal	Cepa	Paciente	Alelo Hap	Longitud de la proteína (aa)	Peso molecular predicho (kDa)
20	P627	8	23	1391	154,29672
	P628	8	23	1391	154,29672
21	P630	8	24	1399	155,08792
22	P639	10	25	1388	153,75668
23	P640	10	26	1438	159,78473
24	P643	10	27	1370	152,05502
	P644	10	27	1370	152,05502
	P645	10	27	1370	152,05502
25	P646	10	28	1470	162,80582
	P647	10	28	1470	162,80582
	P648	10	29	1470	162,82079
	P649	10	28	1470	162,80582
26	P656	11	21	1381	153,00998
27	P657	11	30	1394	154,65695
	P658	11	30	1394	154,65695
	P660	11	30	1394	154,65695
28	P661	12	31	1428	158,45104
29	P664	12	32	1386	154,26562
	P665	12	32	1386	154,26562
	P666	12	32	1386	154,26562
30	P670	13	33	1390	154,33477
	P672	13	33	1390	154,33477
31	P671	13	34	1428	158,428
32	P674	14	35	1480	164,1826
	P675	14	35	1480	164,1826
	P677	14	35	1480	164,1826
	P678	14	35	1480	164,1826
33	P851	14	36	1399	155,83551

Número de repeticiones en tándem del hepta-nucleótido en la región 3' del promotor de los genes *hmw1A* y *hmw2A*.

En **amarillo** y **verde** se marcan cada una de las repeticiones del hepta-nucleótido 5' ATCTTTC 3'. En azul se marca el codón de inicio del gen *hmwA*.

>86-028NP_hmw1A:1829520-1830520 16 repeticiones
 GGAATTTTCAAGCTAAGGAATCCCAATGCAACAAAAATTAGAAAATATTTAAATTTGTCTACTTACTGATGTA
 GATGGCGTGCTCACCGATGGACAACCTTCATTATGACGCCAATGGCGAAGCCATCAAAGTTTTTCACGTGC
 GCGATGGTTTTAGGCATAAAAAATGCTGATGGATGCAGGTATTCAAGTGGCAGTGCCTTCTGGTTCGCGACTC
 CCCTATTTTACGTTCGTCGATGCGGATCTTGGTATTTAAATTTCTTTCTTGGCAAACCTGAAAAAGAA
 ACCGCTTGTTTTTGATCTTATGAAACAAGCAGGCGTCACTGCCGATCAGACCGCTTATATTGGCGATGATA
 GTGTAGATCTCCCCGCTTTGCTGTTTGTGGTGCCTTTTGCAGTGGCTGATGCCCTATTTATGTGAA
 AAATACTGTTGATCATGTACTTTCCACCAATGGCGGCAAAGGGGCTTCCGTGAAATGTCCGATATGATT
 TTACAAGCGCAGGGAAAAATCCTCTGTGTTTGTATACCGCCAAGTTTCCATAAAATCAGTGAAAAATATGG
 GGCAATAAATACTCATTCGTCAGTGTATTGCTTAGTAAAACGAAGTAACCGCAAATATTGCCTATTTAA
 ATTAAGTGTTTAAATATACAATGCAATAGAAAATAAATCAAGATTTTTGTGATGACAAACAACAATACAA
 CAGCTTCTTTGCAATCTATATGCAATAATTTTAAAAAAATAGTATAAATCCGCCATATAAAATGGTATAA
 TCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTC
 TCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTC
 AAGGGAGGGGAGGGGCAAGAATGAAGAGGGGAGCTGAATGAACGCAAATGATAAAGTAATTTAATTGTTCAA
 CTAACCTTAGGAGAAAAATATG

>86-028NP_hmw2A:1378676-1379676_reversecomplementary 23 repeticiones
 CTCGCTTCGCTTTACTTCCACTATTTAAAAATAAATATCCCTTTCAAAGGCAAGGTTTCTACAAAATCAA
 AAGATCCTGCACGTTGCCAGATTTCAATTCAACTCAATTTACAAAATCGGTTGCTCAGATTCGCCTGCA
 ATAATTTTGCCTTGATCGAACGCCACTTCAATTTGGATTGTTGAAATTCAACTAACCAAAAAGTGCGGT
 TAAAATCTGTGGAGAAAAATAGGTTGTAGTGAAGAACGAGGTAATTTGTTCAAAGGATAAAGCTCTCTTAA
 TTGGCATTGGTTGGCGTTTCTTTTTTCGGTTAATAGTAAATTTATATCTGGACGACTATGCAATCCACCA
 ACAACTTACCGTTGGTTTTAAGCGTTAATGTAAGTCTTGGCTTCTTGGCGAATACGTAATCCCATTT
 TTTGTTTAGCAAGAAAAATGATCGGGATAATCATAAATAGGTGTTACCCAAAAATAAATTTTGATGTTCTAA
 AATCGTAAATTTTGCAAGATATTGTGGCAATTCATACCTATTTGTGGCGAAATCGCCAATTTTAATTCA
 ATTTCTTGTAGCATAATATTCCTTACTCAAATTAACGTGTTTGAATATACAATACAATAAAAAATAAATCAA
 GATTTTTGTGATGACAAACAACAATTACAACAGCTTCTTTGCAATCTATATGCAAATTTTTAAAAAAAT
 AGTATAAATCCGCCATATAAAATGGTATAATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTT
 CATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTT
 CATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTT
 GAGGGAAAGGGAAGCGAGAATAAAGAGAGGGATGAATGAACGCAAATGATAAAGTAATTTAATTGTTCAA
 CTAACCTTAGGAGAAAAATATG

>P651_hmw1A 11 repeticiones
 TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACCAAAAAATAAATTTTGATGTTCTAAAATCGTAAATTATGCAAGATCTAGT
 GGCAACTCAATACCTATGAGTGGCGAAATCGCCAATCATAATTCATTTCTTGTAGCATAATATTTCCCA
 CTCAAATCAAAAAGTTAAATATACAAGATAAATAAAAAATAAATCAAGATTTTACAGACGACAAACACCACT
 TACAACAGCCTCTTTGCAATCTATAAGCAAATAAATAAAAAATAAATTTATAAATCCGCCATATAAAATGT
 ATAATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTT
 TTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTT
 CAAATGATAAAGTAATTTAATTGTTCAACTAACCTTAGGAGAAAAATATG

>P651_hmw2A

16 repeticiones

GCGTGGTTTTTGGCTGATTTTGGCTTGAAGTTTGGGGCAATCAGCTTTGGTCACCATCTTATTTTT
CAAAATATTGTGGCAATTCAATACCTATTTGTGGCGAAATCGCCAATTTTAATTCAATTTCTTG
TAGCATAATATTTCCCACTCAAATCAACTGGTTAAATATACAAGATAATAAAAAATAATCAAGA
TTTTTGTGATGACAAACAACAATTACAACAGCTTCTTTGCAATCTATATGCAAATATTTAAAAA
AATAGTATAAAATCCGCCATATAAAATGGTATAATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCT
TTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTT
TCATCTTTTCATCTTTTCACATGAAATGATGAACCGAGGGGAGGGGAGGGGCAAGAATGAAGAGGGA
GCTGAACGAACGCAAATGATAAAGTAATTTAATTGTTCAACTAACCTTAGGAGAAAAATATG

>P652_hmw1A

13 repeticiones

ATAGGTGTTGCCAAAAATAAATTTTGGATGTTCTAAAAATCGTAAATTTTGAAGATATTGTGGC
AATTCAATACCTATTTGTGGCGAAATCGCCAATTTTAATTCAATTTCTTGTAGCATAAATATTTT
CCACTCAAATCAACTGGTTAAATATACAAGATAATAAAAAATAATCAAGATTTTTTGTGATGACA
ACAACAATTACAACAGCTTCTTTGCAATCTATATGCAAATATTTAAAAAATAAGTATAAATCC
GCCATATAAAATGGTATAATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCT
TTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCACATGAAATGATGAACCGA
GGGGAGGGAGGGGCAAGAATGAAGAGGGAGCTGAACGAACGCAAATGATAAAGTAATTTAATTG
TTCAACTAACCTTAGGAGAAAAATATG

>P652_hmw2A

16 repeticiones

TGGACATAGCCGACACCTGTAATCTTCAACGTAGATCATCGCGTGGTTTTTGGCTGATTTTGGCTTGAAGT
TTGGGGCAATCAGCTTTGGTCACCATCTTATTTTTCAAAATATTGTGGCAATTCAATACCTATTTGTGGC
GAAATCGCCAATTTTAATTCAATTTCTTGTAGCATAAATTTCCCACTCAAATCAACTGGTTAAATATAC
AAGATAATAAAAAATAAATCAAGATTTTTTGTGATGACAAACAACAATTACAACAGCTTCTTTGCAATCTAT
ATGCAAATATTTAAAAAATAAGTATAAATCCGCCATATAAAATGGTATAATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTC
ATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTC
ATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCACATGAAATGATGAACCGAGGGGAGGGGAGGGGCAAGAATGAAGAGGGAG
CTGAACGAACGCAAATGATAAAGTAATTTAATTGTTCAACTAACCTTAGGAGAAAAATATG

>P653_hmw1A

18 repeticiones

GTTTAATCGTAATTTTGCAGATATTGTGGCAATTCAATACCTATTTGTGGCGAAATCGCCAATT
TTAATTCAATTTCTTGTAGCATAAATTTCCCACTCAAATCAACTGGTTAAATATACAAGATAA
TAAAAATAAATCAAGATTTTTTGTGATGACAAACAACAATTACAACAGCTTCTTTGCAATCTATA
TGCAAATATTTAAAAAATAAGTATAAATCCGCCATATAAAATGGTATAATCTTTTCATCTTTTCAT
CTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATC
TTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCACATGAAATGATGAACCG
AGGGGAGGGAGGGGCAAGAATGAAGAGGGAGCTGAACGAACGCAAATGATAAAGTAATTTAATT
GTTCAACTAACCTTAGGAGAAAAATATG

>P653_hmw2A 17 repeticiones
 TCGCGTGGGTTTTGCTGATTTTGGCTTGAAGTTTGGGGCAATCAGCTTTGGTCACCATCTTATT
 TTTCAAAATATTGTGGCAATCAATACCTATTTGTGGCGAAATCGCCAATTTAATCAATTTT
 TTGTAGCATAATATTTCCCACTCAAATCAACTGGTTAAATATACAAGATAATAAAAAATAATCA
 AGATTTTTGTGATGACAAACAACAATTACAACAGCTTCTTTGCAATCTATATGCAAATATTTAA
 AAAAAATAGTATAAATCCGCCATATAAAATGGTATAATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTC
 TCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCAT
 CTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCAT
 TGAAGAGGGAGCTGAACGAACGCAAATGATAAAGTAATTTAATTGTTCAACTAACCTTAGGAGA
 AAATATG

>P654_hmw1A 18 repeticiones
 TATTTGTGGCAATCAATACCTATTTGTGGCGAAATCGCCAATTTAATCAATTTCTTGTAGC
 ATAATATTTCCCACTCAAATCAACTGGTTAAATATACAAGATAATAAAAAATAATCAAGATTTT
 TGTGATGACAAACAACAATTACAACAGCTTCTTTGCAATCTATATGCAAATATTTAAAAAATA
 GTATAAATCCGCCATATAAAATGGTATAATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTC
 TCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCAT
 CTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCAT
 TGAAGAGGGAGCTGAACGAACGCAAATGATAAAGTAATTTAATTGTTCAACTAACCTTAGGAGA
 AAATATG

>P654_hmw2A 17 repeticiones
 GTCGTGGTTTTTGGCTGATTTTGGCTTGAAGTTTGGGGCAATCAGCTTTGGTCACCATCTTATTTT
 TCAAAATATTGTGGCAATCAATACCTATTTGTGGCGAAATCGCCAATTTAATCAATTTCTT
 GTAGCATAATATTTCCCACTCAAATCAACTGGTTAAATATACAAGATAATAAAAAATAATCAAG
 ATTTTTGTGATGACAAACAACAATTACAACAGCTTCTTTGCAATCTATATGCAAATATTTAAAA
 AAATAGTATAAATCCGCCATATAAAATGGTATAATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATC
 TTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCT
 TTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCT
 TTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCTTTTCATCT
 AAGAGGGAGCTGAACGAACGCAAATGATAAAGTAATTTAATTGTTCAACTAACCTTAGGAGAAA
 ATATG

ANEXO IV

Alineamiento múltiple de las variantes alélicas de G1pQ en la colección de aislados EPOC.

En rojo se resaltan los 3 sitios de unión a iones divalentes (Ca²⁺).

En verde se resaltan las posiciones con SNPs presentes entre los aislados de la colección de estudio ya descritos anteriormente en otras cepas de *H. influenzae* (Tabla D1).

En azul se resaltan las posiciones con SNPs presentes entre los aislados de la colección de estudio no descritos anterioridad.

En amarillo se resaltan las posiciones con SNPs descritos en estas cepas pero no presentes entre los aislados de la colección de estudio.

```

alelo_18      MKLKTLLALSLLATGVVAGCSSHSSSMANTQMKSHKIIIAHRGASGYLPEHTLESKVLAF
alelo_9      MKLKTLLALSLLATGVVAGCSSHSSSMANTQMKSHKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_4      MKLKTLLALSLLAAGVLACGSSHSSSMANTQMKSHKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_2      MKLKTLLALSLLATGVLAGCSSHSSSMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_8      MKLKTLLALSLLATGVLAGCSSHSSSMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_16     MKLKTLLALSLLATGVLAGCSSHSSSMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_17     MKLKTLLALSLLAAGVLACGSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_14     MKLKTLLALSLLAAGVLACGSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_3      MKLKTLLALSLLAAGVLACGSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_7      MKLKTLLALSLLAAGVLACGSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_13     MKLKTLLALSLLAAGVLACGSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_10     MKLKTLLALSLLAAGVLACGSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_1      MKLKTLLALSLLAAGVLACGSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_11     MKLKTLLALSLLAAGVLACGSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_6      MKLKTLLALSLLAAGVLACGSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_15     MKLKTLLALSLLATGVLAGCSSHSSSMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_5      MKLKTLLALSLLAAGVLACGSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
alelo_12     MKLKTLLALSLLAAGVLACGSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAF
                ****[red]*****[green]*****[blue]****[yellow]*****[red]****
    
```

```

alelo_18      QQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_9      QHADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_4      QHADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_2      QHADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_8      QHADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_16     QHADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_17     QQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_14     QHADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_3      QHADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_7      QQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_13     QHADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_10     QQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_1      QQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_11     QQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_6      QHADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_15     QHADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_5      QHADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
alelo_12     QHADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLE
                *-[red]*****[yellow]*****
    
```

```

alelo_18      MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSFRIFHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_9      MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSFRIFHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_4      ITENFETKDGKQQTQVYPNRFPLWQSFRIHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_2      MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWQSFRIHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_8      MTENFETKDGKQQTQVYPNRFPLWQSFRIHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_16     MTENFETKDGKQQTQVYPNRFPLWQSFRIHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_17     MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWQSFRIHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_14     MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSFRIFHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_3      MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSFRIFHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_7      MTENFETKDGKQQTQVYPNRFPLWKSFRIFHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_13     MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSFRIFHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_10     MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSFRIFHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_1      MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSFRIFHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_11     MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSFRIFHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_6      MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSFRIFHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_15     MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSFRIFHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_5      MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSFRIFHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
alelo_12     MTENFETKDGKQAQVYPNRFPLWKSFRIFHTFEDEIEFIOGLEKSTGKKVGIYPIKAPW
                [red]*****[blue]*****[green]*****[red]*****
    
```

alelo_18 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_9 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_4 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_2 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_8 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_16 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_17 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_14 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_3 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_7 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_13 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_10 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_1 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_11 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_6 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_15 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_5 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
alelo_12 FHHQNGKDIAAETLKVLLKKGYYDKKTDVVYLTQTFDFNELKRIKTELLPQMGMDLKLVLQLI
*****x*****;

alelo_18 AYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_9 AYTDWKETQEKDSKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_4 AYTDWKETQEKDSKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_2 AYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_8 AYTDWKETQEKDSKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_16 AYTDWKETQEKDSKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_17 AYTDWKETQEKDSKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_14 AYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_3 AYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_7 AYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_13 AYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_10 AYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_1 AYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_11 AYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_6 AYTDWKETQEKDSKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_15 AYTDWKETQEKDSKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_5 AYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
alelo_12 AYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDWMPKPGAMAEVVKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIV
*****;

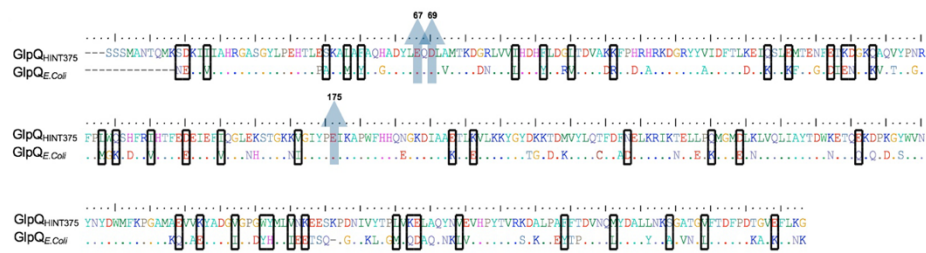
alelo_18 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPAFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_9 YTPLVKELAQYNVELHPYTVRKDALPAFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_4 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPAFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_2 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPAFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_8 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPAFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_16 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPAFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_17 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_14 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPAFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_3 YTPLVKELAQYNVELHPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_7 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_13 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_10 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPAFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_1 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_11 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_6 YTPLVKELAKYNVEVHPYTVRKDALPAFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_15 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_5 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPAFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
alelo_12 YTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSATGVFTDFPDTGVEFL
*****;

alelo_18 KGIK
alelo_9 KGIK
alelo_4 KGIK
alelo_2 KGIK
alelo_8 KGIK
alelo_16 KGIK
alelo_17 KGIK
alelo_14 KGIK
alelo_3 KGIK
alelo_7 KGIK
alelo_13 KGIK
alelo_10 KGIK
alelo_1 KGIK
alelo_11 KGIK
alelo_6 KGIE
alelo_15 KGIK
alelo_5 KGIK
alelo_12 KGIK
***;

Tabla D1. Posiciones con polimorfismos en la secuencia proteica de GIpQ ya descritas para *H. influenzae*. Fuente: uniprot.org/uniprot/Q06282

Posición del SNP	Descripción
13	A → T en la cepa: NCTC 8468.
16	L → V en la cepa: NCTC 8468.
25	N → S en la cepa: NCTC 8468.
28	N → K en la cepa: 6-7626.
34	D → H en la cepa: NCTC 8468.
62	H → Q en la cepa: Eagan, 3639, 3640, 6-7626, HK695 y Minna.
63	S → A en la cepa: Eagan, 3639, 3640, NCTC 8468, 6-7626, HK695 y Minna.
98	Y → H en la cepa: Eagan, 3639, 3640, NCTC 8468, 6-7626, HK695 y Minna.
99	R → H en la cepa: NCTC 8468.
144	K → Q en la cepa: 6-7626.
168	K → R en la cepa: 6-7626.
191	T → A en la cepa: Eagan, 3639, 3640, NCTC 8468, 6-7626, HK695 y Minna.
253	P → S en la cepa: 6-7626.
310	Q → K en la cepa: 6-7626.
327	E → A en la cepa: Eagan, 3639, NCTC 8468, 6-7626, HK695 y Minna.
338	A → V en la cepa: Eagan, 3640, HK695 y Minna.
364	K → E en la cepa: 6-7626.

A



B

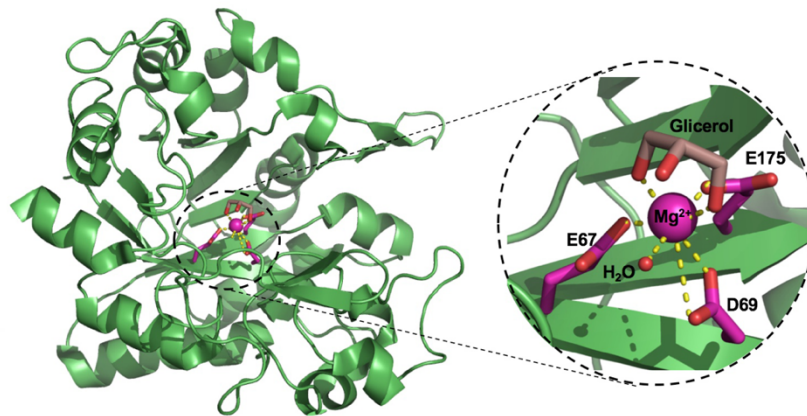


Figura D1. Comparación de las proteínas GlpQ homologas en HINT375 y en *E. Coli*. (A) Alineamiento de sus secuencias de aminoácidos. Los residuos idénticos son representados en *GlpQ_{E.Coli}* como puntos y los que son similares en un recuadro negro. Con flechas se indica la posición de los residuos implicados en la unión de cationes divalentes de Ca^{2+} o Mg^{2+} (B) Estructura tipo barril a/b de la proteína *GlpQ_{E.Coli}* (PDB: 1T8Q). En el círculo, se muestra el detalle de la coordinación del catión.

BORRADOR DE ARTÍCULO CIENTÍFICO

El presente Trabajo Fin de Master se compone de tres partes diferenciadas que abordan distintos aspectos de la pato-adaptación evolutiva de *Haemophilus influenzae*. Para redactar el borrador del artículo, se ha escogido una de las partes del trabajo, en la que se describe un mecanismo de adaptación e hiperinvasor en aislados clínicos de HiNT.

A continuación se presenta una simulación del artículo publicado en la revista *Infection and Immunity*. Esta revista pertenece a la Sociedad Americana de Microbiología (*American Society for Microbiology, ASM*) que tiene un Factor de Impacto (2015/2016) de 3,94 y pertenece al Q1 (fuente: researchgate.com). Se ha elegido esta revista por el contenido científico que publica, concordante con la naturaleza de este estudio. De este modo, “*Infection and Immunity* proporciona nuevos conocimientos sobre las interacciones entre patógenos bacterianos, fúngicos y parasitarios, con sus huéspedes. Las áreas de interés incluyen; mecanismos de patogénesis molecular, factores de virulencia, microbiología celular, modelos experimentales de infección, resistencia/susceptibilidad del huésped y generación de respuestas inmunes innatas y adaptativas.” (fuente: iai.asm.org).

Se ha preparado el siguiente artículo científico conforme las reglas y directrices señaladas por la revista, sin tener en cuenta el idioma, ya que para enviar el manuscrito a esta revista el trabajo tendría que ser redactado en inglés.

Los niveles de expresión de la invasina Hmw1A condicionan la virulencia de *Haemophilus influenzae* no tipificable en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

Sergio Cuesta^{a,b}

Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España^a;
Consejo Superior de Investigaciones Científicas – Madrid, España^b

RESUMEN

En pacientes con enfermedad obstructiva crónica (EPOC), las vías respiratorias bajas son colonizadas por *Haemophilus influenzae* no tipificable (HiNT). Este patógeno oportunista causa infección persistente y recurrente, agravando el curso de la enfermedad y provocando gran parte de las exacerbaciones. La invasina Hmw1A es una proteína de superficie que promueve la adhesión de HiNT a las células epiteliales respiratorias e interviene en la invasión de estas. En este trabajo, mediante el escrutinio de una colección prospectiva de 91 aislados de HiNT aislados del esputo de pacientes EPOC con exacerbación, se ha identificado un grupo clonal integrado por 4 cepas que presentan fenotipo hiperinvasor en células del epitelio respiratorio humano. Se ha estudiado los niveles de expresión de la invasina Hmw1A en este grupo de aislados y se ha observado variación de fase en el promotor del operón *hmw1ABC*, que regula la expresión de Hmw1A. Un menor número de repeticiones de heptanucleótidos en el promotor de *hmw1A* se relaciona con mayores índices de invasión del epitelio respiratorio humano. Además, se ha caracterizado dinámica de infección y la vida intracelular de un aislado clínico de HiNT hiperinvasor.

PALABRAS CLAVE

Haemophilus influenzae, EPOC, Hmw1A, invasina, hiperinvasión, vida intracelular, epitelio respiratorio

INTRODUCCIÓN

Haemophilus influenzae y Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

Las enfermedades respiratorias crónicas y las infecciones respiratorias se sitúan en las primeras posiciones en estudios de prevalencia, morbilidad y mortalidad mundiales, debido a su alto índice de mortalidad y gran impacto socioeconómico (1). La EPOC se caracteriza por una obstrucción progresiva e irreversible de las vías respiratorias, producida por una inflamación crónica y por cambios en la estructura pulmonar (enfisema y fibrosis). Los síntomas principales de la EPOC son la tos crónica y la producción de esputo debida a la hipersecreción de moco (2). Junto a la fase estable y progresiva de la enfermedad, los pacientes EPOC más severos experimentan episodios ocasionales de exacerbación de la enfermedad. Las exacerbaciones de la EPOC repercuten directamente en el agravamiento de la enfermedad, ya que el paciente no llega a experimentar una recuperación total (3). Actualmente, la EPOC es la cuarta causa de muerte a nivel mundial, y presenta una tendencia en aumento; la Organización Mundial de la Salud predice que será la tercera causa de muerte a nivel mundial en 2020 (4). En España, de cada 100000 habitantes, 449 hombres y 238 mujeres mueren a causa de EPOC.

Haemophilus influenzae, es una bacteria a Gram-negativa con morfología cocobacilar pleiomorfa y metabolismo anaerobio facultativo. *H. influenzae* pertenece al filo *Proteobacteria*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Pasteurellales*, familia *Pasteurellaceae*, género *Haemophilus*. Es un microorganismo aislado exclusivamente en el aparato respiratorio humano, no se ha identificado en otras fuentes, animales o ambientales. *H. influenzae* forma parte de la microbiota nasofaríngea humana. Se transmite por inhalación a través de aerosoles o por contacto directo con secreciones respiratorias. *H. influenzae* es aislado en 40-80% de los individuos sanos, con mayor frecuencia en niños que adultos. Además, un individuo puede estar colonizado simultáneamente por varias cepas distintas que cambian a lo largo de su vida (5). La proporción de cepas capsuladas en la microbiota normal es baja, representando un 2-7% modo, *H. influenzae* es capaz de alcanzar el árbol broncoalveolar y establecerse en el nuevo nicho como patógeno oportunista en individuos con la inmunidad pulmonar comprometida (6). *H. influenzae* serotipo b causa infecciones invasivas en niños y

Recibido 08 Septiembre 2017 Devuelto para modificación 12 Septiembre 2017 Aceptado 18 Septiembre 2017

Manuscrito aceptado disponible online 25 Septiembre 2017

Citación Cuesta S. 2017. Los niveles de expresión de la invasina Hmw1A condicionan la virulencia de *Haemophilus influenzae* no tipificable en pacientes con Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica. *Infect Immun* 89:e00076-13 <https://doi.org/10.1128/IAI.00076-13>

© 2017 American Society for Microbiology

Correspondencia a sergio.cuesta@unavarra.es

neumonía aguda (7). El desarrollo de una vacuna basada en la capsula de *H. influenzae* serotipo b ha disminuido las infecciones causadas por este patógeno hasta su casi erradicación (8). Actualmente, HiNT es el patógeno de esta especie con mayor relevancia clínica. HiNT es agente etiológico de infecciones agudas como otitis media, sinusitis, bronquitis, neumonía y conjuntivitis. Además, actúa como patógeno oportunista del tracto respiratorio inferior en pacientes EPOC, fibrosis quística o bronquitis crónica, causando infección persistente, y agravando el curso de la enfermedad respiratoria subyacente (9). En EPOC, la infección por HiNT contribuye a la progresión irreversible de la enfermedad. El análisis de las cepas en pacientes EPOC mostró una co-existencia de distintas cepas, las cuales persisten y son reaisladas de nuevo a lo largo del curso de la enfermedad, sugiriendo una respuesta inmune inefectiva en cuanto a la eliminación del patógeno. El avance de la EPOC, así como factores asociados como el tabaquismo, provocan alteraciones en la morfología e inmunidad de la mucosa respiratoria (10). La amplificación del daño pulmonar contribuye al deterioro progresivo e irreversible del sistema respiratorio, que a su vez empeora la inmunidad del individuo y facilita aún más el acceso de nuevos patógenos al pulmón. Este proceso cíclico se conoce como hipótesis del "círculo vicioso" y explica el modo en el que la enfermedad entra en un bucle sin fin.

Las vías aéreas del paciente EPOC son un ecosistema complejo y dinámico. El tejido enfisematoso se desarrolla fundamentalmente en las regiones superiores de los lóbulos pulmonares, reduciéndose la superficie aérea donde se produce el intercambio gaseoso. Esto se traduce en una menor disponibilidad de oxígeno, a la que HiNT hace frente por ser un organismo anaerobio facultativo. Además, la inflamación crónica resultante de la infección persistente reduce el pH local, creando un ambiente ácido en el que la bacteria debe sobrevivir (11). Por otra parte, el exposoma (totalidad de exposiciones ambientales) del paciente EPOC integra el humo del tabaco, y el tratamiento recibido, lo que constituyen dos mecanismos antropogénicos de selección natural de tipo fuerte y direccional, que se suman a presión inmunitaria del hospedador (12). El paciente EPOC recibe tratamiento antibiótico intermitente, anti-inflamatorio y dual antibiótico/anti-inflamatorio (13). No obstante, el presente régimen terapéutico tiene limitaciones. Por un lado, el uso de antibióticos conlleva la generación y transmisión de resistencias, mientras que la eficacia de los corticoides es limitada debido a la generación de insensibilidades a este tipo de fármacos en pacientes que los toman de forma crónica (14,15). Por otro lado, HiNT es un patógeno intracelular facultativo, lo que puede ser clave para provocar la infección crónica, persistente y recurrente que se observa en la EPOC (16). La persistencia intracelular de HiNT en el epitelio respiratorio genera un nicho donde el patógeno está protegido de fármacos que no atraviesan las membranas celulares, por lo que la mayoría de terapias no acceden al microorganismo (12).

De este modo, HiNT, está obligado a desarrollar modificaciones pato-adaptativas al invadir de forma persistente el nicho que constituye el pulmón enfisematoso. La bacteria presenta un amplio arsenal genético que puede favorecer su evolución adaptativa en el pulmón del paciente EPOC. La gran diversidad y variabilidad genética en HiNT permite que este patógeno oportunista se establezca de forma persistente en nuevos nichos distintos al habitual, causando infección e inflamación prolongadas, como ocurre en las vías respiratorias bajas de los pacientes EPOC.

Aspectos moleculares de virulencia y patogénesis de HiNT

La interacción huésped-patógeno de HiNT empieza en las vías aéreas superiores, en las que es capaz de asentarse como microorganismo comensal asintomático, proceso que implica su establecimiento en la mucosa nasofaríngea y la evasión del sistema inmune del hospedador. En determinadas circunstancias asociadas a enfermedades respiratorias crónicas, HiNT consigue acceder a los pulmones, donde establece nuevo nicho patogénico y estimula la inflamación crónica en una nueva etapa sintomática. Los factores de virulencia son aquellos elementos moleculares de la fisiología bacteriana que dotan a la bacteria de la capacidad para colonizar y provocar infección, resultando determinantes para su patogénesis (7).

El inicio de la infección por HiNT implica el establecimiento de la bacteria en la mucosa respiratoria. En este contexto, HiNT presenta un arsenal de adhesinas, moléculas que facilitan el reconocimiento de estructuras celulares del huésped y estabilizan la interacción con el epitelio respiratorio y la matriz extracelular. Generalmente, son moléculas con una alta variabilidad en HiNT, debido a que no todas las cepas de HiNT presentan en su genoma los genes correspondientes a cada adhesina, y a que existen polimorfismos entre alelos de distintas cepas. Además, la expresión de algunas adhesinas está controlada por mecanismos de variación de fase (17). Se trata, por tanto, de un conjunto heterogéneo de moléculas que intervienen en la adhesión de HiNT al epitelio respiratorio humano.

Hap es una proteína autotransportadora de *H. influenzae* que actúa como adhesina. Presenta homología con proteasas de tipo serina IgA1 de *H. influenzae*, las cuales proteolizan inmunoglobulinas humanas (18,19). Hap es sintetizada como un precursor proteico que contiene un péptido señal en el extremo N-terminal, un dominio proteasa (Hap_s) y un dominio intermembrana (Hap_β) en el extremo C-terminal. El péptido señal es responsable de que la proteína se exporte del citoplasma al espacio periplásmico. Una vez allí, el dominio Hap_β, que posee estructura de barril β, se inserta en la membrana externa y permite la translocación del dominio Hap_s a la superficie bacteriana, donde se autoproteoliza, liberándose y quedando Hap_β embebido en la membrana externa (20). La proteína de Hap, con el dominio Hap_s asociado al Hap_β en la membrana externa, promueve la adhesión de HiNT a células epiteliales. Además, la retención de Hap_s en la superficie bacteriana es responsable de eventos de agregación entre bacterias y formación de microcolonias en la superficie epitelial (21). De este modo, durante estadios iniciales de la infección por HiNT, la autoproteólisis de Hap se inhibe como mecanismo de adhesión. Contrariamente, cuando Hap se autoproteoliza, el dominio Hap_s se libera de la

superficie, permitiendo a las bacterias individualizarse, diseminarse y migrar a nuevos nichos susceptibles de infección. Por otro lado, la proteólisis de Hap es también un mecanismo de evasión de elementos solubles de la inmunidad del huésped.

Por otro lado, HiNT posee dos proteínas de alto peso molecular, Hmw1A y Hmw2A (*High Molecular Weight protein*) que comparten 71% identidad y 80% similitud en sus secuencias aminoacídicas (22). Estas proteínas, de 125 y 120 kDa respectivamente, se han encontrado en aproximadamente 75% de las cepas de HiNT analizadas. En contraposición, no se han identificado estas adhesinas en ninguna cepa capsulada de *H. influenzae* (7). Hmw1A y Hmw2A están codificadas por los operones *hmw1ABC* y *hmw2ABC*, respectivamente, que se encuentran en locis diferenciados del genoma de HiNT y que tienen distintas especificidades adherentes, siendo Hmw1 esencial y Hmw2 dispensable (23,24). Los genes *hmw1A* y *hmw2A* codifican las proteínas Hmw1A y Hmw2A, respectivamente, y se distinguen entre sí por el dominio de unión a receptores eucariotas glicoproteicos, de crucial importancia funcional (25). Estos genes están flanqueados aguas abajo por los genes *hmwB* y *hmwC*, ambos con gran porcentaje de homología e identidad (99% y 96%, respectivamente), siendo intercambiables entre los operones de estas adhesinas. Hmw1A y Hmw2A se localizan en la membrana externa de la bacteria. Hmw1B y Hmw2B se encargan de externalizar Hmw1A y Hmw2A a través del periplasma mediante el sistema de secreción Sec (26). Hmw1C y Hmw2C participan en la estabilización de Hmw1A y Hmw2A en la membrana externa mediante su glicosilación (27). Se han identificado eventos de variación de fase en el promotor de estos operones, como mecanismo de regulación de su expresión. El aumento de repeticiones del heptanucleótido 5'ATCTTTC3' en los promotores de los operones *hmw1ABC* y *hmw2ABC* se asocia a una reducción de la cantidad de Hmw1A y Hmw2A, lo que constituye una ventaja evolutiva para HiNT, ya que es un mecanismo de evasión de la defensa inmune adaptativa del huésped, y se relaciona con una mayor persistencia de los aislados (28,29).

HiNT es un microorganismo intracelular facultativo. Su localización intracelular actúa como nicho protector con condiciones ambientales distintas a las extracelulares, a las que HiNT debe hacer frente mediante mecanismos de adaptación evolutiva (Garmendia *et al.* 2012, Clementi & Murphy 2011). El modelo de infección del epitelio respiratorio humano por HiNT presenta un conjunto de etapas bien diferenciadas (Fig. 1):

- (i) Adhesión: Las bacterias se adhieren a la superficie epitelial gracias a un repertorio de adhesinas que interaccionan con receptores eucariotas.
- (ii) Agregación y formación de microcolonias. Proceso en el cual intervienen Hap, Hmw1 y Hmw2.
- (iii) Invasión bacteriana: Se estimulan cambios en el citoesqueleto de la célula huésped que favorecen la internalización de HiNT.
- (iv) Localización intracelular no proliferativa: HiNT co-localiza inicialmente en compartimentos de tipo endosoma temprano que maduran a compartimentos ácidos de tipo endosoma tardío (16).

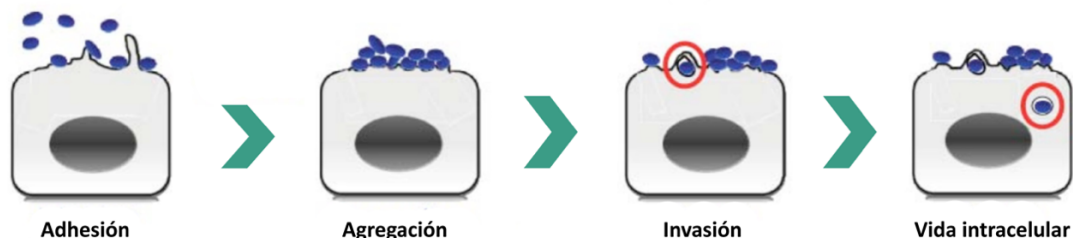


FIG 1 Modelo de infección del epitelio respiratorio humano por HiNT. Representación gráfica de las cuatro etapas del modelo de infección de HiNT: (i) adhesión bacteriana a la superficie celular, proceso mediado por un repertorio de adhesinas bacterianas y receptores eucariotas; (ii) agregación bacteriana y formación de microcolonias; (iii) invasión bacteriana; (iv) vida intracelular no proliferativa. En círculos rojos se marcan los procesos de internalización y compartimentalización intracelular de HiNT en células del epitelio respiratorio.

Se ha demostrado con éxito que la introducción de los operones *hmw1ABC* y *hmw2ABC* en cepas poco adherentes de HiNT resulta en transformantes que muestran altos niveles de adherencia sobre células epiteliales (24). Además, trabajo reciente del grupo de investigación han identificado alelos de Hmw1A como determinantes de la infección de células epiteliales del aparato respiratorio por HiNT. Estas evidencias apuntan a un posible papel de Hmw1 como invasina, no sólo aumentando los índices de adhesión, sino también proporcionando un mecanismo de entrada bacteriana a las células eucariotas mediante la formación de agregados bacterianos, que se traduce en la aparición de un fenotipo hiperinvasor de células del epitelio respiratorio (25).

La invasión bacteriana dirige a HiNT a un estadio intracelular de tipo reservorio que puede ser responsable de infecciones persistentes y recurrentes en el paciente EPOC. En este estudio se ha examinado el papel de las Hap y HmwA en la progresión de la infección y en la dinámica de la vida intracelular de HiNT, aspecto crucial a la hora de desarrollar nuevos antimicrobianos eficaces.

RESULTADOS

Descripción de la colección de cepas de HiNT aisladas de pacientes EPOC empleada en este trabajo

Se utilizó una colección de cepas clínicas aisladas de muestras de esputo recogidas de 13 pacientes EPOC severos ingresados por exacerbación de la enfermedad en el *Hospital Universitari de Bellvitge* (HUB), Barcelona. Se trata de una colección longitudinal prospectiva de 91 aislados, recogida durante 6 años (2005-2014) (Fig. 2). No fue necesario tomar el consentimiento informado a los pacientes ya que el procedimiento realizado es parte de la rutina del servicio de microbiología del hospital. La identidad de estos pacientes ha sido preservada durante todo el trabajo.

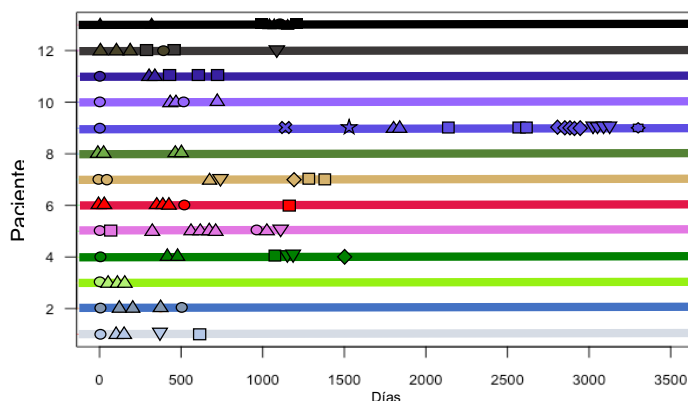


FIG 2 Estructura de la colección de aislados clínicos EPOC. La colección está integrada por 13 pacientes, representados en la figura por 13 líneas y distintos colores. La componen 92 aislados que se representan mediante símbolos geométricos; cepas representadas con mismo símbolo pertenecen al mismo grupo clonal. La distancia entre los símbolos indica la ventana temporal entre el aislamiento de las cepas.

Los aislados clínicos de esta colección han sido previamente caracterizados por el grupo de investigación. Inicialmente, se estableció la relación genómica entre cepas tras su análisis mediante electroforesis de campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE), distribuyendo las 91 cepas en 44 genotipos. A continuación, la secuencia del genoma completa de todas las cepas se obtuvo mediante secuenciación por síntesis Illumina. Esta tecnología permite tener la secuencia nucleotídica de todo el genoma de HiNT en un número discreto de *contigs*. Para mejorar la calidad de las secuencias y disponer de un genoma completo de referencia por tipo clonal, se eligió un aislado de cada grupo clonal para ser secuenciado con el sistema de secuenciación a tiempo real de una única molécula de ADN de Pacific Biosciences (PacBio), obteniendo todo el genoma de estas cepas en un solo *contig*. Tras el análisis genómico comparado de todos los aislados, se establecieron 33 grupos clonales.

La información relativa a las cepas que conforman esta colección de aislados clínicos EPOC se presenta disponible en la Tabla 1.

Fenotipo autoagregativo de los aislados clínicos

El ensayo de autoagregación bacteriana se realizó con todas las cepas de la colección. El 76,92% de las cepas presenta una eficiente autoagregación ($DO_{600}[t=5h] = 0,35-0,5$); el 8,79% de las cepas no autoagregan ($DO_{600}[t=5h] = 0-0,15$); y el 14,28% restante presentan un fenotipo intermedio ($DO_{600}[t=5h] = 0,15-0,35$). La distribución de aislados de la colección respecto a su capacidad autoagregativa se muestra en las Tabla 1 y Figura 3.

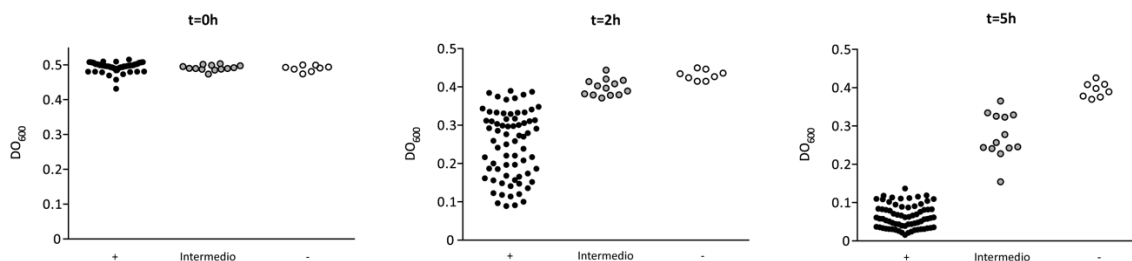


FIG 3 Los 91 aislados clínicos de HiNT presentes en la colección en estudio muestran variabilidad respecto a su capacidad autoagregativa. Suspensiones bacterianas realizadas en PBS1X y normalizadas a $DO_{600} = 0,5$ fueron preparadas a partir de la biomasa de cada aislado crecido en agar chocolate. La DO_{600} se monitorizó en la parte superior de la columna, que permaneció estática durante 5 h. Se muestra la distribución de las cepas a tres tiempos; $t=0h$, $t=2h$ y $t=5h$, de izquierda a derecha. Las cepas que autoagregan (+) se representan con círculos negros; las que no autoagregan (-) con blancos; aquellas que presentan un fenotipo intermedio están representadas con círculos grises.

TABLA 1 Información relativa a las cepas clínicas de HiNT que componen la colección de aislados clínicos EPOC.

Paciente	Cepa	Fecha aislamiento	Tipo clonal	Presencia gen <i>hap</i>	Variante de Hap	Presencia gen <i>hmwA</i>	DO ₆₀₀ t=5h	Autoagregación
1	P588	13-02-12	1	Si	1	?	0,378	No
1	P589	22-05-12	2	Si	2	No	0,3755	No
1	P590	10-07-12	2	Si	2	No	0,1095	Si
1	P591	12-02-13	3	Si	3	Si	0,0695	Si
1	P592	18-10-13	4	Si	4	?	0,3345	Medio
2	P593	02-01-12	5	Si	5	?	0,0665	Si
2	P594	02-05-12	6	Si	6	No	0,323	Medio
2	P595	19-07-12	6	Si	6	No	0,076	Si
2	P596	11-01-13	6	Si	6	No	0,329	Medio
2	P597	17-05-13	7	Si	7	?	0,3895	No
4	P598	22-12-12	8	Si	8	Si	0,081	Si
4	P599	28-01-13	9	Si	10	No	0,11	Si
4	P600	06-02-13	10	Si	11	No	0,1085	Si
4	P601	10-04-13	10	Si	11	No	0,112	Si
4	P602	16-05-13	10	Si	11	No	0,048	Si
5	P603	22-02-10	11	Si	12	?	0,102	Si
5	P604	11-04-11	1	Si	1	No	0,409	No
5	P605	08-06-11	1	Si	1	No	0,3697	No
5	P606	07-02-13	12	Si	13	?	0,031	Si
5	P607	03-05-13	13	Si	14	No	0,0475	Si
5	P608	24-05-13	13	Si	14	No	0,365	Medio
5	P609	08-04-14	9	Si	10	?	0,0245	Si
6	P610	21-03-11	14	Si	15	Si	0,037	Si
6	P611	20-05-11	15	Si	16	?	0,0155	Si
6	P612	07-02-12	10	Si	11	No	0,062	Si
6	P613	28-09-12	10	Si	11	No	0,118	Si
6	P614	26-11-12	10	Si	11	No	0,3255	Medio
6	P615	25-01-13	10	Si	11	No	0,084	Si
6	P616	11-02-13	10	Si	11	No	0,095	Si
6	P617	13-11-13	16	Si	17	Si	0,1367	Si
6	P618	13-01-14	10	Si	11	No	0,06	Si
7	P620	08-09-10	10	Si	11	No	0,0615	Si
7	P621	23-09-10	10	Si	11	No	0,079	Si
7	P622	25-08-11	10	Si	11	No	0,0825	Si
7	P623	13-10-11	10	Si	11	No	0,0575	Si
7	P624	25-10-11	10	Si	11	No	0,0665	Si
7	P625	06-02-12	18	Si	21	Si	0,061	Si
7	P626	15-11-13	19	Si	22	?	0,0575	Si
8	P627	19-01-09	20	Si	23	Si	0,039	Si
8	P628	20-02-09	20	Si	23	Si	0,0355	Si
8	P629	24-11-10	10	Si	11	?	0,0535	Si
8	P630	21-01-11	21	Si	24	?	0,031	Si
8	P631	01-05-12	8	Si	8	Si	0,0435	Si
8	P632	27-07-12	10	Si	11	No	0,0355	Si
8	P633	26-10-12	10	Si	11	No	0,058	Si
9	P634	22-02-11	16	Si	17	Si	0,046	Si
9	P635	08-03-11	16	Si	17	Si	0,0305	Si
9	P636	05-06-12	16	Si	17	Si	0,1045	Si
9	P637	30-06-12	16	Si	17	Si	0,0905	Si
10	P638	19-01-05	17	Si	20	?	0,051	Si
10	P639	03-03-08	22	Si	25	?	0,244	Medio
10	P640	31-03-09	23	Si	26	Si	0,2277	Medio
10	P641	28-12-09	1	Si	1	Si	0,0565	Si
10	P642	19-01-10	1	Si	1	Si	0,0875	Si
10	P643	28-11-10	24	Si	27	No	0,2777	Medio
10	P644	13-02-12	24	Si	27	No	0,241	Medio
10	P645	27-03-12	24	Si	27	No	0,2455	Medio
10	P646	25-10-12	25	Si	28	No	0,1155	Si
10	P647	13-11-12	25	Si	28	No	0,408	No
10	P648	29-11-12	25	Si	29	No	0,4255	No
10	P649	24-12-12	25	Si	28	No	0,398	No
10	P650	18-01-13	6	Si	6	No	0,1105	Si
10	P651	06-05-13	9	Si	10	Si	0,0445	Si
10	P652	18-05-13	9	Si	10	Si	0,021	Si
10	P653	20-06-13	9	Si	10	Si	0,119	Si
10	P654	05-07-13	9	Si	10	Si	0,089	Si
11	P656	20-01-12	26	Si	21	?	0,2425	Medio
11	P657	26-03-13	27	Si	30	No	0,068	Si
11	P658	22-05-13	27	Si	30	No	0,0825	Si
11	P660	08-01-14	27	Si	30	No	0,082	Si
12	P661	10-02-10	28	Si	31	?	0,0283	Si
12	P662	30-12-10	8	Si	9	Si	0,044	Si
12	P663	17-01-11	8	Si	9	?	0,1135	Si
12	P664	04-04-11	29	Si	32	No	0,257	Medio
12	P665	15-10-11	29	Si	32	No	0,071	Si
12	P666	01-02-12	29	Si	32	No	0,081	Si
13	P667	13-02-10	16	Si	18	Si	0,0305	Si
13	P668	24-05-10	16	Si	18	Si	0,0435	Si
13	P669	16-08-10	16	Si	18	Si	0,0295	Si
13	P670	28-11-10	30	Si	33	No	0,1543	Medio
13	P671	10-03-11	31	Si	34	Si	0,032	Si
13	P672	07-05-11	30	Si	33	No	0,0625	Si
13	P673	05-02-13	18	Si	21	Si	0,04	Si
14	P674	01-02-00	32	Si	35	?	0,0333	Si
14	P675	13-12-00	32	Si	35	?	0,034	Si
14	P676	16-10-02	16	Si	19	?	0,0335	Si
14	P677	29-12-02	32	Si	35	?	0,029	Si
14	P678	23-03-03	32	Si	35	?	0,026	Si
14	P679	09-05-03	33	Si	36	?	0,022	Si
14	P851	23-03-03	16	Si	19	?	0,0965	Si
14	P853	09-05-03	16	Si	19	Si	0,051	Si

En *H. influenzae*, el fenotipo de autoagregación está asociado a genes que codifican tres proteínas de superficie, el autotransportador Hap (32) y las adhesinas Hmw1A y Hmw2A (25). En este trabajo, se utilizará la terminología HmwA para hacer referencia a Hmw1A y Hmw2A de forma conjunta, a no ser que sea necesario referirse a uno de los dos alelos en concreto.

Diversidad alélica de Hap en la colección de aislados HiNT

La secuencia del gen *hap* de las 91 cepas en estudio fue extraída de sus genomas y traducida para analizar la diversidad alélica de este autotransportador. Se identificaron 36 variantes alélicas de Hap (Tabla 1). Se realizó un alineamiento múltiple de los 36 alelos utilizando la herramienta online Clustal Omega (ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo).

Ochenta y nueve cepas presentan alelos de *hap* completos, que codifican proteínas cuyo tamaño varía entre 1.351 (alelo 3) y 1.480 (alelo 35) aminoácidos. Como excepción, las cepas P589 y P590 presentan un alelo de *hap* truncado, debido a una mutación puntual que introduce un codón de parada que produce la pérdida de los ~300-400 aminoácidos del extremo C-terminal. Estos aminoácidos corresponden al barril β , parte de la proteína anclada a la membrana externa, por lo que estas cepas son mutantes naturales no funcionales para Hap.

Todos los alelos de Hap presentan la secuencia correspondiente al péptido señal conservada. Este fragmento corresponde a los primeros 25 aminoácidos del extremo N-terminal, y tiene la secuencia NH₂-MKKTVFRLNFLTACI/VSLGIV/ASQAWA-COOH. El péptido señal se identificó mediante la herramienta online predictiva SignalP, a partir de la secuencia de la proteína (cbs.dtu.dk/services/SignalP/). Además, todos alelos presentan la triada catalítica NH₂-GDSGS-COOH conservada.

Existen diversos puntos calientes de variabilidad en la secuencia de la proteína Hap. Este aspecto se traduce en que existen regiones que acumulan múltiples polimorfismos (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) e incluso pequeñas inserciones/deleciones (*Small insertions and deletions*, INDELS). Esta variabilidad se encuentra mayoritariamente en el dominio pasajero, que es el dominio catalítico de la proteína (Fig. 4).

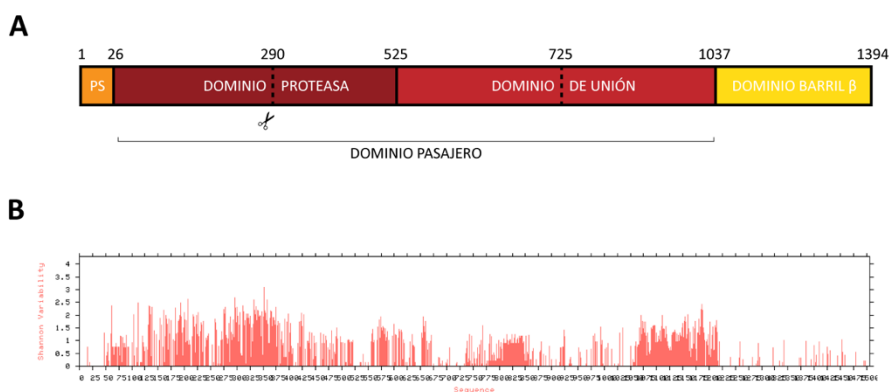


FIG 4 Estructura y variabilidad de la proteína Hap en HiNT. (A) Esquema de los dominios funcionales de la proteína Hap en base al alelo presente en la cepa N187, aislado de *H. influenzae* en el que esta proteína fue inicialmente caracterizada (33). (B) Representación gráfica de la variabilidad de Hap utilizando un alineamiento múltiple de todas las secuencias proteicas de los aislados (exceptuando las cepas P589 y P590 que presentan un alelo truncado). El gráfico se ha realizado con una herramienta bioinformática online (imed.med.ucm.es/PVS/) (34).

La diversidad alélica de Hap está asociada a la clonalidad de las cepas. Existen 30 grupos clonales en los que sus cepas presentan el mismo alelo de Hap por grupo clonal, estando el grupo clonal está integrado por una (16 grupos clonales) o por más de una cepa (14 grupos clonales). Contrariamente, los grupos clonales 8, 16 y 25 contienen cepas con distintos alelos de Hap entre las cepas del mismo grupo clonal.

No se identificó una asociación paciente-alelo de Hap, ya que un mismo paciente puede presentar distintos aislados, cada uno correspondiente a un periodo de exacerbación, con alelos de Hap iguales o distintos. Esta observación puede deberse a la naturaleza policlonal de la infección de HiNT en estos pacientes. Dado que HiNT es un patógeno oportunista, diferentes cepas coexisten en el pulmón EPOC, y cada cepa aislada corresponde posiblemente a la cepa más prevalente en ese momento (ejemplo: el paciente 1 tiene 5 aislamientos, y estas cepas contienen 4 alelos Hap diferentes). Además, un mismo alelo de Hap puede estar presente en diferentes aislados de pacientes distintos, posiblemente debido a la transmisión de cepas entre pacientes (ejemplo: el alelo 11 está presente en cepas de 4 pacientes diferentes). Por lo general, cepas con el mismo alelo de Hap se encuentran agrupadas dentro del mismo grupo clonal, con la excepción del alelo 21, que está presente en cepas de los grupos clonales 18 y 26, sugiriendo eventos de transmisión horizontal de genes entre aislados.

En conjunto, todas las cepas HiNT analizadas tienen el gen *hap*, independientemente de su capacidad autoagregativa. Además, esta proteína presenta una alta diversidad, y no se identificaron alelos específicos relacionados con la capacidad para autoagregar de los aislados. Así, la variabilidad alélica de Hap no se asocia directamente, en las condiciones testadas, con el fenotipo autoagregativo de HiNT.

Escrutinio de aislados clínicos de HiNT hiperinvasores en el epitelio respiratorio humano

La cepa HiNT 86-028NP es un aislado clínico de otitis media que presenta características de cepa hiperinvasora en epitelio respiratorio humano. Trabajos previos del grupo de investigación han descrito este fenotipo hiperinvasor, presente en cepas que se caracterizan por (i) autoagregar, (ii) presentar una tasa elevada de adhesión epitelial, (iii) presentar una alta tasa de invasión epitelial, (iv) presentar un alto porcentaje de bacterias que, una vez internalizadas, se localizan en compartimentos subcelulares de tipo endosoma tardío (25).

A continuación, se realizó un escrutinio de aislados hiperinvasores en la colección de cepas clínicas de HiNT en estudio. Evidencias previas apuntan que HmwA está involucrada en el fenotipo hiperinvasor de *H. influenzae*, más concretamente en la capacidad autoagregativa de las cepas. Por ello, se seleccionó un primer set de cepas que (i) autoagregan, y (ii) presentan en su genoma los genes *hmw1A* y *hmw2A* (Tabla 1). Siguiendo estos criterios, la selección se enfocó en cepas con genoma secuenciado mediante la tecnología PacBio, para disponer de las secuencias de estos genes con la mayor certeza posible (Fig. 5A).

Así, se seleccionaron las cepas P636, P641, P652, P662 y P669. Se realizaron ensayos de invasión epitelial en células A549, usando HiNT 86-028NP como control positivo de fenotipo hiperinvasor. En el caso del aislado P652, se obtuvieron índices de invasión comparables a los de 86-028NP (Fig. 5B). Este aislado pertenece al grupo clonal 9 (Tabla 1), en el que también se incluyen las cepas P599, P609, P651, P653 y P654. P599 y P609, aisladas de los pacientes 4 y 5, respectivamente, presentaron niveles de invasión epitelial menores a los de HiNT 86-028NP. P651, P652, P653 y P654, aisladas del paciente 10, presentaron tasas altas (P651 y P652 comparables a 86-028NP) y medias (P653 y P654) de invasión epitelial. De hecho, los niveles de invasión epitelial de P652 son significativamente mayores que los de 86-028NP ($p < 0,001$) (Fig. 5C).

A continuación, se realizaron ensayos de invasión epitelial en células A549 depositadas sobre cubreobjetos de vidrio e inmunomarcaje para evaluar los eventos de co-localización intracelular. En las infecciones con P651 y P652, se utilizó una MOI 1:1, mientras que en las infecciones con P653 y P654, se empleó una MOI 100:1. Se observó que, con P651, P652, P653 y P654, la mayoría de bacterias localizaron en compartimentos subcelulares que expresan el marcador Lamp-1, característico de endosoma tardío (Fig. 5D).

Papel de HmwA en la hiperinvasión del epitelio respiratorio por HiNT

Trabajos previos del grupo de investigación sugieren que determinados alelos de *hmw1A* están involucrados en el fenotipo hiperinvasor de HiNT (25).

Analizando el entorno genómico de la cepa HiNT 86-028NP, se observa que el operón *hmw1ABC* se localiza en un locus adyacente al gen *yrbA*, mientras que el operón *hmw2ABC* está en un locus proximal al gen *radA*, al igual que en la cepa 12 de HiNT (22). La Tabla 2 muestra los porcentajes de identidad entre adhesinas de ambas cepas, en base a alineamientos dos a dos realizados con la herramienta *online Pairwise Sequence Alignment* EMBOSS Needle (ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle). De este modo, se determinó que en P652, el entorno genómico de estos operones es distinto; el operón *hmw1ABC* es *radA*-proximal, mientras que el operón *hmw2ABC* es *yrb1*-adyacente, como se ha descrito previamente para la cepa HiNT375 (25).

TABLA 2 Análisis comparado de la secuencia proteica de las adhesinas HmwA_{P652} con sus parálogos en 86-028NP. Se representa el porcentaje de identidad a nivel de secuencia nucleotídica basado en alineamientos EMBOSS Needle.

Locus	Cepa	Hmw1A _{86-028NP}	Hmw2A _{86-028NP}	Mejor hit
<i>yrb1</i> -adyacente	86-028NP	100%	69,0%	<i>hmw1A</i>
	P652	65,0%	70,7%	<i>hmw2A</i>
<i>radA</i> -proximal	86-028NP	69,0%	100%	<i>hmw2A</i>
	P652	90,6%	67,0%	<i>hmw1A</i>

Se extrajo la secuencia nucleotídica de *hmw1A* y *hmw2A* de la cepa P652. Hmw1A_{P652} tiene un peso molecular (*Molecular weight*, Mw) predicho de 162,796 kDa, y Hmw2A_{P652} tiene un Mw de 167,846 kDa. Las predicciones de Mw se realizaron mediante la herramienta bioinformática *online ExpASY* (web.expasy.org/compute_pi/). Extractos celulares de las cepas hiperinvasoras y la cepa control 86-028NP fueron preparados y utilizados para analizar la traducción de HmwA mediante *western blotting*. Se empleó el anticuerpo primario cobaya-anti-HmwA (gp85), que se une de forma específica a las proteínas Hmw1A y Hmw2A. En cuanto a Hmw1A, se observó una mayor cantidad de proteína en las cepas P651 y P652 respecto a las cepas P653 y P654. Respecto a Hmw2A, no se observaron diferencias en los niveles proteicos entre las 4 cepas. La cepa 86-028NP presenta únicamente la banda correspondiente a Hmw1A (Fig. 6A).

Cantidades elevadas de Hmw1A se relacionan con niveles altos de invasión del epitelio respiratorio. Existen evidencias que detallan una regulación de los niveles de expresión de *hmw1A* y *hmw2A* mediante variación de fase (29). La variación de fase viene determinada por un número variable de repeticiones en

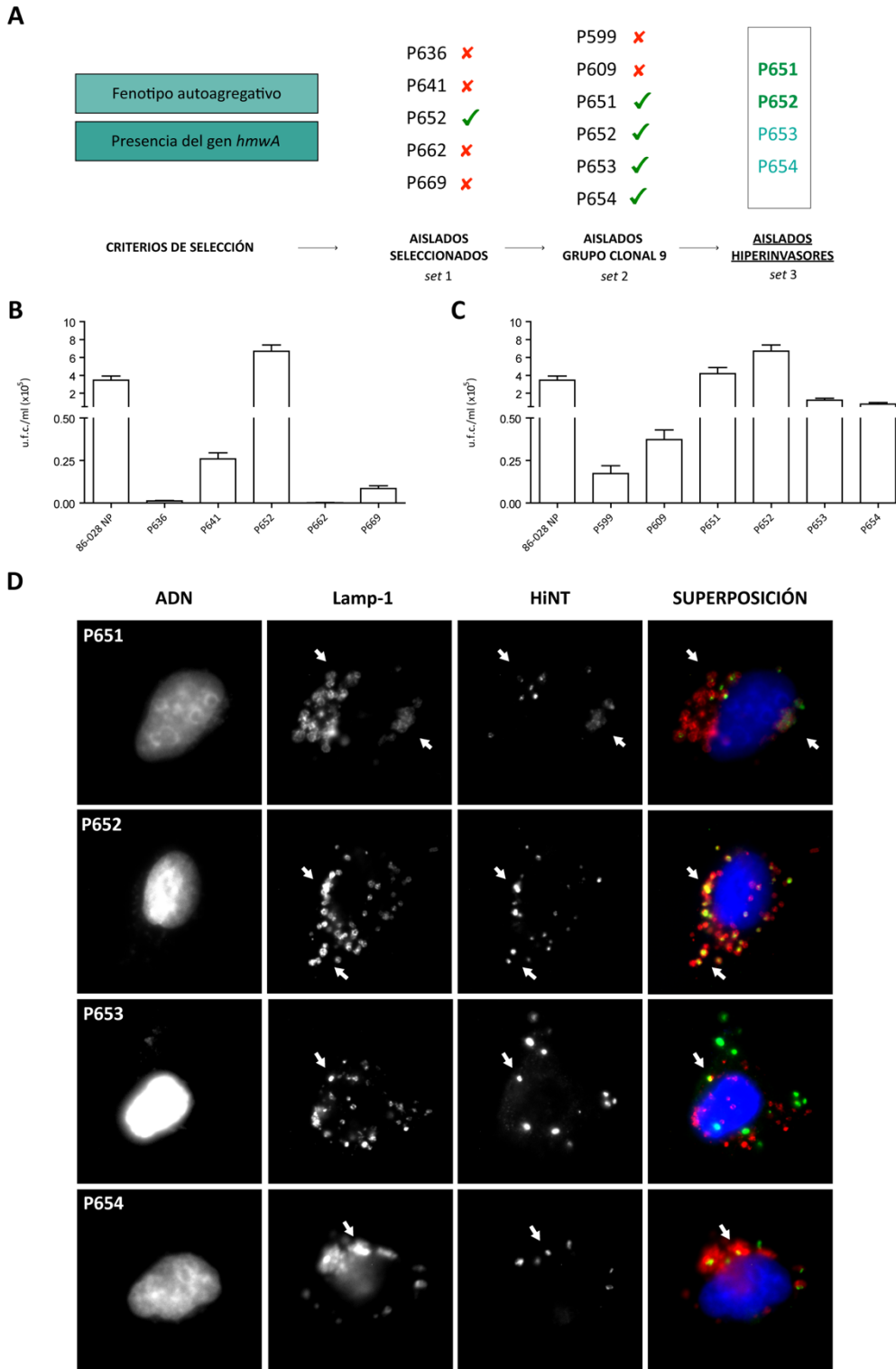


FIG 5 Escrutinio de la colección de aislados clínicos EPOC para identificar cepas de HiNT con fenotipo hiperinvasor. (A) Flujo de trabajo para la identificación de aislados hiperinvasores. Se seleccionó un primer *set* de cepas candidatas. Se identificó una cepa hiperinvasora, P652. Se seleccionó un nuevo *set* de cepas candidatas con los aislados del grupo clonal 9. Finalmente, el conjunto de aislados hiperinvasores quedó integrado por P651, P652, P653 y P654. (B) Niveles de invasión del epitelio respiratorio por el primer grupo de cepas candidatas. (C) Niveles de invasión del epitelio respiratorio por el segundo grupo de cepas candidatas. (D) Imágenes de inmunofluorescencia correspondientes a ensayos de invasión de células A549 depositadas en cubreobjetos de vidrio. El ADN se tiñó con el agente intercalante Hoechst 33342 (azul). Los compartimentos celulares con características de endosoma tardío se tiñeron con el Ab 1° ratón-anti-LAMP-1 y el Ab 2° burro-anti-ratón conjugado con RRX (rojo). Las bacterias (HiNT) se tiñeron con el Ab 1° conejo-anti-HiNT y el Ab 2° burro-anti-conejo conjugado con Alexa 488 (verde). Algunos de los eventos de co-localización bacteria:Lamp-1 se señalan mediante las flechas.

tándem del hepta-nucleótido 5'ATCTTTC3' en el promotor de ambos genes (28), que también se relaciona con la persistencia de HiNT en el pulmón EPOC. Así, a mayor número de estas repeticiones, mayor es la persistencia de la cepa, y menor es la expresión de *hmwA*. Las cepas P651, P652, P653 y P654 presentan niveles de invasión epitelial diferentes entre sí. Un análisis previo de las regiones génicas codificantes (*Open Reading Frames*, ORFs) determinó que no existen SNPs entre estas cepas, por lo que las diferencias observadas en el fenotipo invasor no vienen determinadas por polimorfismos en regiones codificantes. No obstante, este análisis no compara las regiones intergénicas, por lo que polimorfismos en regiones promotoras pueden ser responsables de las diferencias fenotípicas observadas. Por ello, los promotores de *hmw1A* y *hmw2A* de las cepas P651, P652, P653 y P654 fueron secuenciados utilizando los primers p_hmw1A_seq_F y p_hmw1A_seq_R y los p_hmw1A_seq_F y p_hmw1A_seq_R. Las secuencias promotoras de ambos genes se extrajeron del genoma de referencia de 86-028NP depositado en la base de datos de NCBI (ncbi.nlm.nih.gov/genome/165?genome_assembly_id=299369). El número de repeticiones en el promotor del gen *hmw2A* es similar en las cepas P651, P652, P653 y P654, y no se observan diferencias en los niveles de proteína. En el caso de *hmw1A*, el número de repeticiones en P651 y P652 es menor que en P653 y P654, lo que se traduce en niveles decrecientes de Hmw1A entre la primera y última cepa de este set (Fig. 6B).

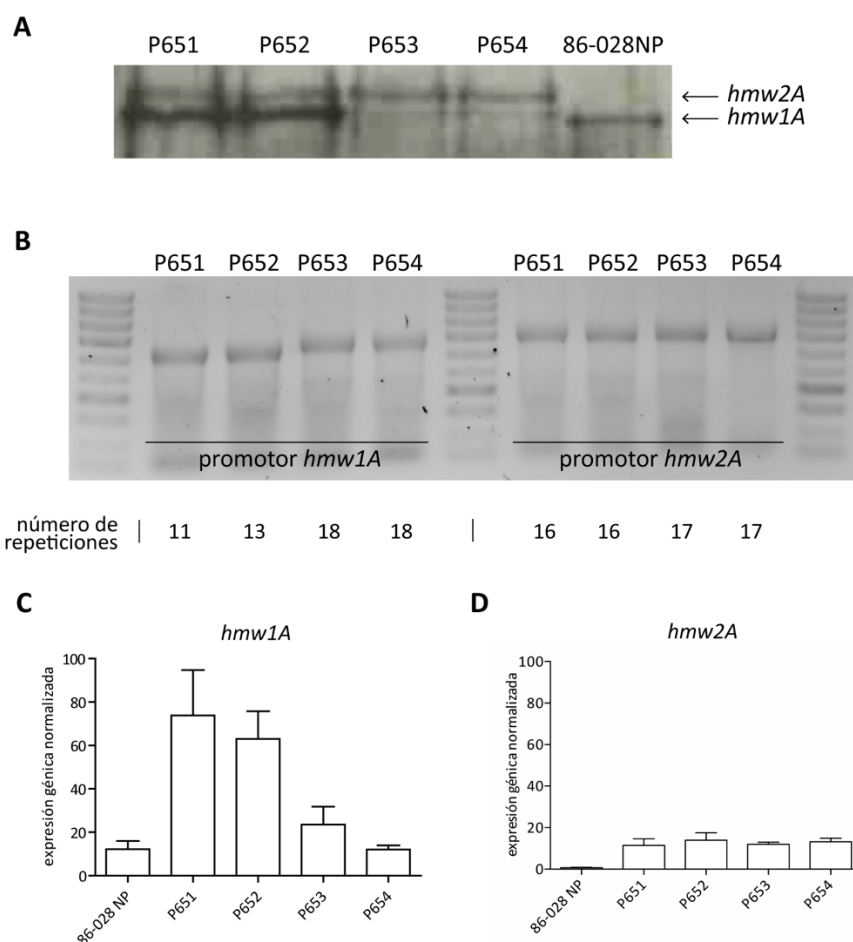


FIG 6 Caracterización de *hmw1A* y *hmw2A* en las cepas clínicas P651, P652, P653 y P654. (A) Niveles de Hmw1A y Hmw2A en extractos celulares de las cepas de estudio analizado mediante *western blot* con un anticuerpo anti-HmwA. (B) Gel de electroforesis con los productos de PCR resultantes de amplificar la región 3' de los promotores de *hmw1A* y *hmw2A*. Se indica el número de repeticiones del heptanucleótido 5'ATCTTTC3'. (C) Niveles de expresión del gen *hmw1A*. (D) Niveles de expresión del gen *hmw2A*.

Para relacionar directamente la variación de fase en las regiones promotoras de los genes que codifican las adhesinas HmwA con una expresión diferencial de las mismas, se cuantificaron los niveles de expresión de los genes *hmw1A* y *hmw2A* en P651, P652, P653, P654. Se realizaron extracciones de ARN de cultivos a $DO_{600} = 0,5$ de estas cepas, así como de 86-028NP, que se empleó como cepa hiperinvasora control. Las cantidades relativas de ARNm de los genes *hmw1A* y *hmw2A* se midieron mediante qPCR. Para P651, P652, P653, P654, se emplearon los cebadores *hmw1A_F* + *hmw1A_R* en el caso de *hmw1A*, y *hmw2A_F* + *hmw2A_R* para *hmw2A*, diseñados a partir de la secuencia de los genes en P652. Para 86-028NP, se utilizaron los cebadores *hmw1A_F* + *hmw1A_R* en el caso de *hmw1A*, y *hmw2A_F_NP* + *hmw2A_R_NP* para *hmw2A*. P651 y P652 presentaron mayores niveles de expresión de *hmw1A* que P653 y P654. En cambio, no se

observaron diferencias significativas en la expresión del gen *hmw2A* entre aislados. En 86-028NP, se observó producción de ARNm del gen *hmw1*, pero no de *hmw2A* (Fig. 6C y Fig. 6D).

En conjunto, estos datos muestran la variación de fase en el promotor de *hmw1A*, asociada al fenotipo hiperinvasor observado en la infección epitelial. Esto se traduce en un aumento de repeticiones en esta región promotora, que conlleva una menor expresión del gen, que está asociada una menor traducción de la proteína y a su vez, un menor nivel de invasión epitelial. De este modo, una mayor expresión de *hmw1A* en P651 y P652 respecto P653 y P654 puede explicar las diferencias en el fenotipo hiperinvasor de estas aislados clínicos HiNT.

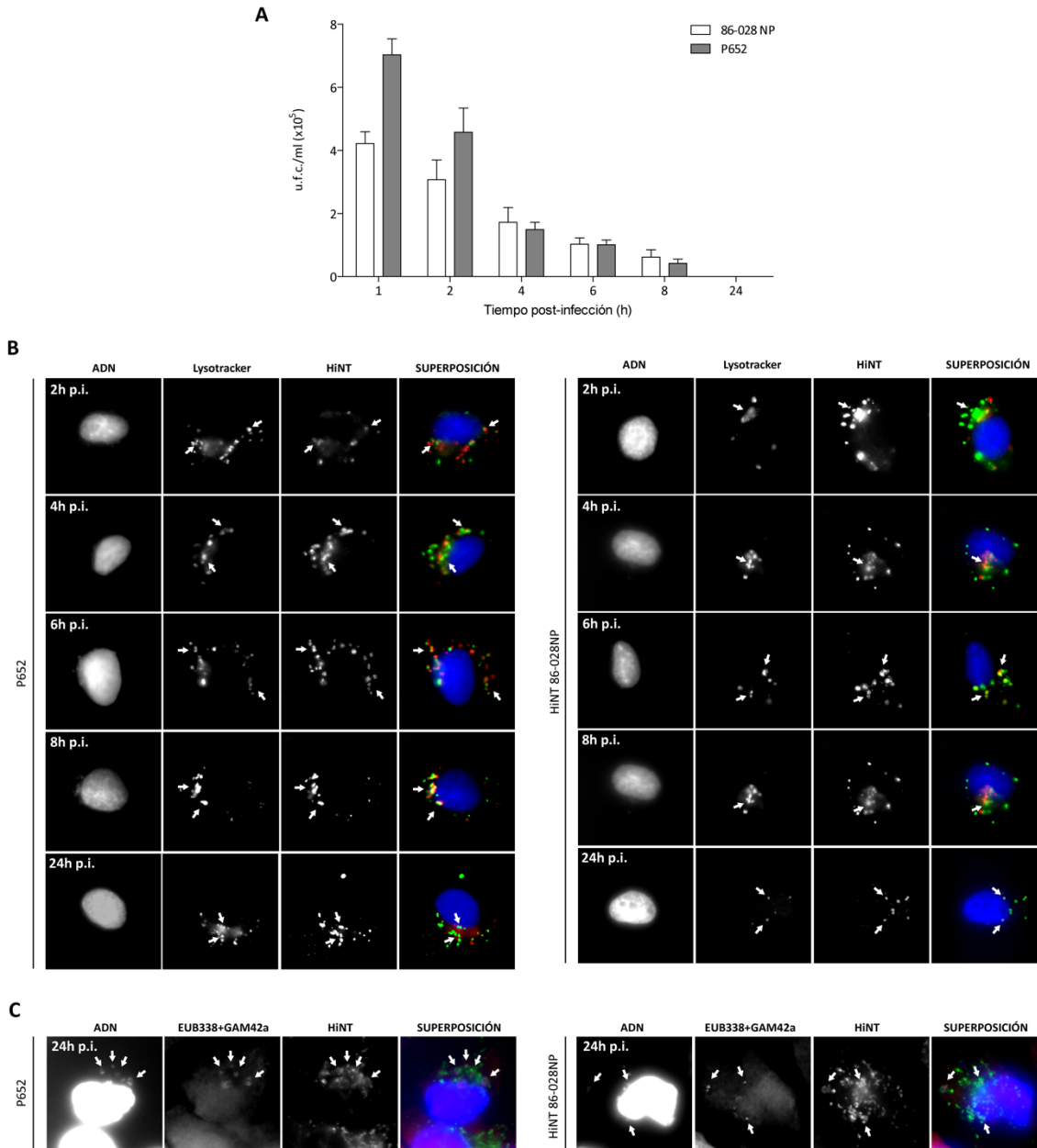


FIG 7 Monitorización de la vida intracelular de HiNT en células A549. (A) Experimento de invasión y vida intracelular epitelial mediante recuento de u.f.c. viables a tiempos variables de infección. Las células estuvieron 2 h en contacto con HiNT; tras este tiempo se realizaron varios tiempos de infección ($t = 1, 2, 4, 6, 8$ y 24 h) manteniendo las bacterias con gentamicina, observando una caída progresiva en el número de u.f.c./ml. (B) Imágenes de inmunofluorescencia correspondientes a ensayos de infección en células A549 depositadas en cubreobjetos de vidrio durante tiempos de infección variable ($t = 2, 4, 6, 8$ y 24 h). El ADN se tiñó con el agente intercalante Hoechst 33342 (azul). Las bacterias (HiNT) se tiñeron con el Ab 1° conejo-anti-HiNT y con el Ab 2° burro-anti-conejo conjugado con Alexa 488 (verde). Los compartimentos subcelulares ácidos se marcaron con $0,5 \mu\text{M}$ LysoTracker RedDN99/pocillo 45 min antes de la fijación (rojo). Algunos eventos de co-localización bacteriana en compartimentos subcelulares con pH ácido se han señalado con flechas blancas. (C) Presencia de bacterias metabólicamente activas pero no cultivables a tiempos prolongados de infección epitelial por HiNT. Se utilizó la técnica FISH, empleando las sondas fluorescentes EUB338 y Gam42a para marcar de forma específica el ARNr bacteriano. Se señalan bacterias intracelulares metabólicamente activas con flechas blancas.

Monitorización de la vida intracelular de HiNT en el epitelio respiratorio

Se ha identificado un aislado hiperinvasor en la colección de cepas clínicas de HiNT en estudio, P652, que se caracteriza por presentar altos niveles de invasión en el epitelio respiratorio humano. Por otro lado, la vida intracelular de HiNT en compartimentos subcelulares tras la invasión epitelial se ha descrito previamente para la cepa no hiperinvasora HiNT375 (16). En este trabajo, se ha analizado la localización intracelular de las cepas hiperinvasoras P652 y 86-028NP mediante infección de 2 h y observación de la vida intracelular de ambas cepas en una ventana temporal que varía entre 2 y 24 h.

Tras 2 h de infección, la localización intracelular se analizó a tiempos variables en medio RPMI con gentamicina ($t = 1, 2, 4, 6, 8$ y 24 h). Seguidamente, las células epiteliales se lisaron y se preparó un banco de diluciones en PBS1X que se plaquéó en sBHI agar para el recuento de u.f.c. viables. Se observa que la infección inicial fue mayor en la cepa P652 que en 86-028NP. A partir del tiempo 2 h post-infección, el número de bacterias intracelulares se redujo progresivamente de un modo paralelo en ambas cepas, hasta llegar a niveles no detectables a 24 h post-infección (Fig. 7A).

Estas mismas infecciones se realizaron en células A549 depositadas sobre cubreobjetos de vidrio, que se procesaron para su análisis mediante microscopía de inmunofluorescencia. En este caso, se utilizó una MOI 10:1. El marcador fluído *Lysotracker RedDN99* se utilizó para marcar compartimentos subcelulares con pH ácido. Así, se analizó la naturaleza de los compartimentos en los que se localiza HiNT durante invasiones prolongadas del epitelio respiratorio. Ambas cepas evolucionaron intracelularmente de modo paralelo, observándose una disminución de la carga bacteriana intracelular a lo largo del tiempo. Ambas cepas co-localizan de forma similar en compartimentos subcelulares ácidos. Esta co-localización en compartimentos ácidos se observó en todos los tiempos post-infección analizados (Fig. 7B).

Por otro lado, se observa una divergencia importante entre el recuento bacteriano en placa y el análisis mediante microscopía de fluorescencia a 24 h post-infección. A este tiempo no se plaquearon bacterias en sBHI agar, si bien, sí que se observaron bacterias dentro de las células A549 mediante microscopía. Para determinar la viabilidad de estas bacterias intracelulares, se marcaron los ribosomas bacterianos mediante FISH, utilizando las sondas EUB338 y Gam42a, específicas para las subunidades de ARNr bacteriano 16S y 23S, respectivamente. De este modo, se observaron bacterias metabólicamente activas, pero no cultivables, a tiempos largos de infección epitelial (24 h) (Fig. 7C).

Estas observaciones apuntan a un mecanismo de supervivencia intracelular no replicativa de cepas hiperinvasoras de HiNT en células del epitelio respiratorio, similar al descrito previamente en aislados no hiperinvasores (16).

DISCUSIÓN

Trabajos previos afirman que las cepas de HiNT aisladas de esputos de pacientes con exacerbación EPOC son mayoritariamente de nueva adquisición (35–37). De este modo, las exacerbaciones estarían producidas por cepas de nueva entrada, que no son reconocidas por los anticuerpos generados previamente por cepas colonizadoras. Esta idea contrasta con observaciones posteriores, y con la naturaleza de la colección de aislados clínicos de HiNT utilizada en este estudio. Es una colección prospectiva de 91 aislados crónicos que producen exacerbación EPOC. Por la forma en la que son aisladas las cepas desde las muestras de esputo, únicamente se reaisla la cepa que se encuentra en mayor proporción en ese momento de la infección, lo que constituye una debilidad a la hora de analizar la co-existencia de varias cepas de HiNT en cada exacerbación. El análisis genómico de los aislados clínicos HiNT en estudio, ha revelado que cepas reaisladas del mismo paciente en momentos distintos de la enfermedad, pueden pertenecer al mismo aislado clonal. Así, tanto cepas colonizadoras crónicas como cepas de nueva entrada, pueden ser las causantes de los episodios de exacerbación de la EPOC. Igualmente, la colección de aislados EPOC en estudio soporta trabajos previos que demuestran la persistencia de algunas cepas de HiNT, que son reaisladas a lo largo del tiempo (38). Esta persistencia de cepas puede estar ligada a una respuesta inmune inefectiva por parte del huésped, así como al desarrollo de mecanismos de adaptación por parte de HiNT.

El fenotipo de autoagregación bacteriana en *H. influenzae*, es ampliamente conocido (25), su representatividad en la naturaleza infectiva de la EPOC no ha sido abordada. En este estudio, se analizó la capacidad autoagregativa de un conjunto de 91 aislados clínicos de HiNT. Una frecuencia de aparición significativa del fenotipo autoagregativo fue observada en las cepas que integran esta colección, autoagregando 70 cepas y presentando un fenotipo intermedio otras 13, constituyendo en conjunto el 91,2% del total. Este fenotipo, así como la formación de microcolonias, han sido previamente descritos y asociados a una proteína de superficie de HiNT; la adhesina Hap (21,32). Hap ha sido caracterizada y se ha estudiado su papel durante el proceso infectivo del epitelio respiratorio humano por HiNT (39). Tras observar la alta representatividad de cepas autoagregativas en pacientes EPOC, en este trabajo se ha analizado por primera vez, la relevancia de este fenotipo en la naturaleza, así como la implicación de Hap en él. Se observó que 89 cepas presentan el gen *hap* completo, por lo que casi la totalidad de las cepas presentan un alelo funcional. No obstante, Hap es una proteína variable, y su variabilidad se concentra en la región de la proteína expuesta en la superficie bacteriana y que es potencialmente antigénica. Esta región, al estar expuesta a las células del huésped y a elementos solubles del sistema inmune, constituye una ventaja evolutiva ya que su variabilidad permite a HiNT poder ser reconocido por el huésped o evadir la respuesta inmune. En conjunto, este trabajo supone el análisis más exhaustivo de la variabilidad de la adhesina Hap en aislados clínicos realizado hasta la fecha.

En cuanto a la asociación Hap-fenotipo de autoagregación, no se pudo establecer una relación directa, ya que existen cepas que no autoagregan y sí presentan el gen *hap* completo. Las diferencias entre los distintos alelos de Hap pueden traducirse en diferencias funcionales, a su vez relacionadas con las diferencias fenotípicas observadas. Además, el fenotipo de autoagregación puede no deberse únicamente a la funcionalidad de Hap, ya que cepas con el mismo alelo de *hap* tienen capacidades autoagregativas diferentes. Las cepas P589 y P590 tienen el mismo alelo de Hap truncado y potencialmente no funcional, ya que les falta parte del gen que codifica para el barril β , que es el que está encajado en la membrana externa, localizando adecuadamente la proteína. A pesar de tener el mismo alelo, P589 no autoagrega mientras que P590 sí lo hace, por lo que, probablemente, existen otros determinantes genéticos asociados al fenotipo de autoagregación.

Por otra parte, se ha descrito previamente un fenotipo hiperinvasor de HiNT, relacionado con el de autoagregación y con la presencia de determinados alelos de *HmwA* (25). Del modo en el que se ha realizado el escrutinio, se encontraron en la colección en estudio 4 aislados que presentan fenotipo hiperinvasor; P651, P652, P653 y P654. Estas cepas, del mismo tipo clonal, son aislados EPOC, por lo que presentan un origen anatómico distinto al de la cepa hiperinvasora 86-028NP, que es un aislado de otitis media pediátrica. Además del fenotipo de hiperinvasión, se ha encontrado en estas cepas un rasgo de adaptación en base a la variación de fase de los operones *hmw1ABC* y *hmw2ABC*, asociado a la expresión y traducción de las invasinas *Hmw1A* y *Hmw2A*. Este mismo tipo de adaptación fue descrito previamente a nivel de genotipo, observando diferencias en el número de repeticiones de heptanucleótidos (28), y a nivel traduccional, detectando cantidades decrecientes de estas proteínas en aislados de HiNT persistentes (29). En este trabajo, se asocia la variación de fase observada en la región promotora de *hmw1A* con cambios en su expresión génica y en la capacidad invasora de las cepas de este tipo clonal.

Si bien recientemente, el grupo de investigación observó que un determinado alelo de *Hmw1A* estaba involucrado en la capacidad invasiva de HiNT, no se conoce la representatividad de este mecanismo en la naturaleza de HiNT en el contexto de la EPOC (25). Las observaciones de este trabajo indican que las cantidades de *Hmw2A* se mantienen constantes en P651, P652, P653 y P654, mientras que *Hmw1A* disminuye su expresión y traducción entre aislados, debido a un aumento paulatino del número de repeticiones del heptanucleótido 5'ATCTTTC3' en el promotor del operón. De este modo, las cepas P651 y P652 presentan altas cantidades de *Hmw1A* lo que les otorga una elevada capacidad de entrada en células epiteliales respiratorias humanas, y P653 y P654 expresan en menor medida esta proteína, permitiendo la evasión del sistema inmune, respuesta adaptativa descrita previamente (29). Con este trabajo, se describe un nuevo sentido biológico a este mecanismo de adaptación por variación de fase. Así, se amplía la asociación *Hmw1A*-fenotipo hiperinvasor; determinados alelos de *hmw1A*, así como sus niveles de expresión están, al menos parcialmente, relacionados con el fenotipo hiperinvasor.

Los ensayos de infecciones prolongadas del epitelio respiratorio humano realizados con la cepa P652 mostraron un estadio intracelular en compartimentos subcelulares ácidos de tipo endosoma tardío, en los que la bacteria se encuentra en estado no replicativo y metabólicamente activa. Estos resultados son consistentes con trabajos previos del grupo de investigación, que describen este mismo tipo de dinámica intracelular en la cepa HiNT375 (16). P652 es un aislado de EPOC hiperinvasor, mientras que HiNT375 es un aislado de otitis media no hiperinvasor, por lo que las observaciones realizadas no se limitan a un único origen anatómico. La dinámica de vida intracelular de P652 y HiNT375 es de la misma naturaleza, por lo que estudios posteriores serán necesarios para determinar la implicación del fenotipo hiperinvasor en la dinámica de vida intracelular de las cepas.

De este modo, en el presente estudio, se describe que el fenotipo de autoagregación bacteriana está ampliamente representado en cepas clínicas de HiNT aisladas de pacientes EPOC durante episodios de exacerbación. Además, la presencia de la adhesina Hap está muy conservada entre aislados clínicos de HiNT, si bien posee un alto grado de variabilidad concentrado en la región funcional expuesta en la superficie bacteriana. Por otro lado, se ha identificado una serie clonal de HiNT aislada de un paciente EPOC que presenta variación de fase en la región promotora del operón *hmw1ABC* como estrategia pato-adaptativa que modula la expresión de la invasina *Hmw1A*. De este modo, variantes alélicas de la invasina *Hmw1A*, así como sus niveles de expresión, están, al menos parcialmente, relacionados con el fenotipo hiperinvasor de HiNT en el epitelio respiratorio humano. Por último, HiNT presenta un estadio intracelular no replicativo en compartimentos subcelulares ácidos de tipo endosoma tardío, que puede constituir un ambiente protector para la bacteria, independientemente de su capacidad invasiva y origen anatómico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *H. influenzae* se crecieron en agar chocolate PolyViteX (agar chocolate) (Biomérieux) o en Infusión Cerebro Corazón Agar suplementado con 10 $\mu\text{g/ml}$ hemina y 10 $\mu\text{g/ml}$ β -nicotin adenin dinucleótido (β -NAD) (*supplemented Brain Heart Infusion Agar*, sBHI agar) (Conda). Los cultivos líquidos se realizaron en sBHI, con agitación (200 r.p.m.) a 37°C, con 5% CO_2 . Alternativamente, se utilizó agar Müller Hinton Fastidioso (MH-F agar) (Biomérieux). Cuando fue necesario, se añadió Spec50.

Para cada una de las cepas utilizadas, se generó un *stock* recogiendo la biomasa bacteriana crecida en una placa del medio correspondiente, en 1 ml de TSB (Tryptone Soya Broth)-glicerol 10%, que se almacenó a -80°C. Para su empleo, las cepas se sacaron *de novo* siempre a partir de los *stocks* almacenados, nunca reaislando a partir de placas anteriores.

En el caso de HiNT, las cepas de interés se crecieron en agar chocolate durante 15 h, previo a su uso en los experimentos descritos a continuación. Para el crecimiento de pre-inóculos en matraces de 100 ml, se inocularon 2-3 colonias crecidas en agar chocolate en 10 ml de sBHI y se incubaron durante 10 h en agitación a 100 r.p.m y 37°C. Salvo excepciones, los bancos de dilución para el recuento de unidades formadoras de colonias (u.f.c.) se realizaron en tampón fosfato salino, PBS1X (*Phosphate Buffered Saline*: 145 mM NaCl; 7,7 mM NaHPO₄; 2,27 mM NaH₂PO₄, pH 7,2) y se plaquearon en placas de sBHI agar.

Ensayo de autoagregación bacteriana

Cepas de *H. influenzae* crecidas en agar chocolate se emplearon para generar una suspensión bacteriana en PBS1X, consistente en 35-40 ml con DO₆₀₀ = 0,5. Para ello, se utilizó un tubo tipo *Falcon* de 50 ml a modo de columna. El número de bacterias viables al inicio del ensayo se cuantificó mediante dilución seriada en PBS1X y plaqueo en sBHI agar. La columna se mantuvo en condiciones de esterilidad, a Tª ambiente, estática, sin ser perturbada al tomar muestras de la parte superior para medir DO₆₀₀ cada hora, durante un total de 5 h. Se realizaron al menos 2 réplicas biológicas para cada cepa analizada (n≥2).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron con el objetivo de amplificar fragmentos específicos de ADN. Para ello, se empleó la enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific), una polimerasa termostable de gran procesividad y elevada fidelidad. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl, como sigue: 10,8 µl agua Milli-Q; 4 µl tampón de reacción GC 5X (proporcionado por el fabricante); 1 µl MgCl₂ 50 mM; 1 µl de cada cebador 100 µM; 0,6 µl dNTPs 10 mM; 0,4 µl DMSO; 0,2 µl ADN polimerasa 2 U/µl y 1 µl ADN molde. Los cebadores empleados fueron: p_hmw1A_seq_F (ATAGGTGTTGCCCAAAAATAA); p_hmw1A_seq_R (ACGCACCTTCATGCGAGCAGG); p_hmw2A_seq_F (TGGACATAGCCGACACCTGTA); p_hmw2A_seq_R (ACGCACCTTCATGCGAGCAGG). Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización inicial (30 s; 98°C); 35 ciclos de desnaturalización (10 s; 98°C) + anillamiento (30 s; 55°C) + elongación (30 s/kb a amplificar; 72°C); elongación final (10 min; 72°C).

Cultivo celular y mantenimiento de líneas celulares

La línea celular de carcinoma humano A549 (ATCC CCL185), derivada de neumocitos tipo II, se utilizó en experimentos de infección por *H. influenzae* de células epiteliales inmortalizadas. Las células A549 se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado con suero bovino fetal inactivado a 60°C durante 1 h (STF descomplementado) (Sigma-Aldrich), tampón HEPES 10 mM (Sigma-Aldrich) y un cóctel de antibióticos y antimicóticos formado por penicilina 100 U/ml, sulfato de estreptomina 0,1 mg/ml y anfotericina B 0,5 µg/ml (RPMI completo).

Las células se crecieron en botellas de plástico de 25 cm² en una atmósfera saturada de humedad al 95%, a 37°C y con 5% CO₂. El crecimiento de esta línea celular se produce de manera adherente, por lo que antes de alcanzar la total confluencia del cultivo (cuyo las células ocupan ~90% del espacio disponible en la base del frasco) se realizaron pases. Para ello, las células fueron despegadas de la base de la botella utilizando tripsina (Sigma-Aldrich), para su recuento mediante una cámara de Neubauer, dilución y crecimiento en una nueva botella.

Infección de células en cultivo

Todos los ensayos de infección de células A549 con *H. influenzae* se realizaron en placas de 24 pocillos, habiendo realizado el depósito de células correspondiente para tener ~4-5·10⁵ células/pocillo en el momento de realizar el experimento, lo que se corresponde con un ~90% de confluencia. Cuyo los experimentos se diseñaron para observar eventos de infección mediante microscopía de inmunofluorescencia, se colocó en cada pocillo un cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro previo al depósito de las células sobre este. El medio RPMI completo se reemplazó por RPMI completo sin suero bovino fetal (RPMI -STF) 16 h antes del ensayo de infección, para sincronizar la población celular en la misma etapa del ciclo celular. Previo a la infección, las células se lavaron tres veces con PBS1X y se añadió 1 ml de EBSS/pocillo (*Earle's Balanced Salt Solution*) (Invitrogen). Se preparó una suspensión bacteriana de la cepa de interés en PBS1X ajustada a DO₆₀₀ = 1 a partir de biomasa crecida en chocolate agar (*input*). Se utilizó un volumen variable de este *input* (según el experimento) para infectar las células en EBSS. Durante la infección, las placas de 24 pocillos se incubaron a 37°C, 5% CO₂. Todos los ensayos de infección epitelial se realizaron mediante métodos previamente optimizados y descritos por el grupo de investigación (16,39,40).

Adhesión bacteriana al epitelio respiratorio

Se determinó la adhesión de las cepas de *H. influenzae* al epitelio respiratorio. Para ello las células A549 fueron infectadas, a no ser que se especifique lo contrario, con 100 µl del *input* de la cepa de interés/pocillo para obtener una multiplicidad de infección de ~100 bacterias por célula (MOI 100:1). Tras 30 min, tiempo durante el cual las bacterias se adhieren a la superficie celular, sin invadir las células, cada pocillo fue lavado 3 veces con 1 ml PBS1X/pocillo, para eliminar bacterias no adheridas a las células. Seguidamente, las células epiteliales fueron lisadas mecánicamente tras ser expuestas durante 10 min a 300 µl PBS1X-saponina 0,025%/pocillo. Este lisado se empleó para realizar un banco de diluciones en PBS1X, que se plaqueó en sBHI agar para el recuento de u.f.c., y de esta forma estimar la tasa de adhesión epitelial por *H. influenzae*.

De forma alternativa, cuyo el ensayo de adhesión se realizó sobre cubreobjetos de vidrio, tras los 30 min de infección, se realizaron 5 lavados con PBS1X, se añadió a cada pocillo 300 µl de PFA 3% y se incubó a Tª ambiente durante 20 min. A continuación, se hicieron 3 lavados con PBS1X y las placas se conservaron a 4°C con 1 ml PBS1X/pocillo hasta la posterior tinción de cubreobjetos.

Invasión bacteriana en el epitelio respiratorio

Se determinó la invasión de las cepas de *H. influenzae* en el epitelio respiratorio. Para ello, las células A549 fueron infectadas, a no ser que se especifique lo contrario, con 200 µl del *input* de la cepa de interés/pocillo, para obtener una multiplicidad de infección de ~100 bacterias por célula (MOI 200:1). Tras 2 h, tiempo durante el cual las bacterias se adhieren e invaden las células, cada pocillo fue lavado 3 veces con 1 ml PBS1X/pocillo, para eliminar bacterias no adheridas a las células. En este momento, se incubó cada pocillo con 1 ml de medio RPMI completo, sin el cóctel de antibióticos, con gentamicina 200 µg/ml, durante 1 h (RPMI -ATB +Gm₂₀₀). La gentamicina es un antibiótico que no permeabiliza la membrana de las células eucariotas y elimina de forma selectiva la población bacteriana extracelular sin afectar las bacterias que ya hubieran invadido las células. Tras este tiempo, cada pocillo fue sometido a 3 lavados consecutivos con 1 ml de PBS1X. Seguidamente, las células epiteliales fueron lisadas mecánicamente tras ser expuestas durante 10 min a 300 µl PBS1X-saponina 0,025%/pocillo. Este lisado se empleó para realizar un banco de diluciones en PBS1X, que se plaqueó en sBHI agar para el recuento de u.f.c. y así estimar la tasa de invasión epitelial por *H. influenzae*.

Alternativamente, cuyo el ensayo de invasión se realizó sobre cubreobjetos de vidrio, tras la hora con RPMI -ATB +Gm₂₀₀, se realizaron 5 lavados con PBS1X, se añadieron 300 µl PFA 3%/pocillo, y las placas se incubaron a Tª ambiente durante 20 min. A continuación, se hicieron 3 lavados con PBS1X y las placas se conservaron a 4°C con 1 ml PBS1X/pocillo hasta la posterior tinción de cubreobjetos.

Vida intracelular bacteriana en el epitelio respiratorio

Este ensayo es una variante del descrito en el apartado 12.2, en el que se utilizaron tiempos de infección más largos para monitorizar la dinámica de la localización intracelular de HiNT en el epitelio respiratorio.

Las infecciones se realizaron del mismo modo que en el ensayo de invasión previamente descrito. Tras la primera hora con RPMI –ATB +Gm₂₀₀, el medio se sustituyó por RPMI –Ab con gentamicina 16 µg/ml (RPMI –ATB +Gm₁₆) con el propósito de que una exposición prolongada a gentamicina no dañe la integridad de las células. Los tiempos de infección variaron como se detalla en la Tabla 3.

TABLA 3 Tiempos de infección en ensayos de vida intracelular.

Tiempo postGm	Descripción
1h	2h infección + 1h Gm ₂₀₀
2h	2h infección + 1h Gm ₂₀₀ + 1h Gm ₁₆
4h	2h infección + 1h Gm ₂₀₀ + 3h Gm ₁₆
6h	2h infección + 1h Gm ₂₀₀ + 5h Gm ₁₆
8h	2h infección + 1h Gm ₂₀₀ + 7h Gm ₁₆
24h	2h infección + 1h Gm ₂₀₀ + 23h Gm ₁₆

Los pocillos con cubreobjetos se procesaron de la misma que en ensayos de adhesión e invasión, lavando los cubreobjetos 3 veces con 1 ml PBS1X/pocillo, fijándolos durante 20 min con PFA 3%, y conservándolos a 4°C con 1 ml de PBS1X hasta su posterior tinción.

Tinción y microscopía de fluorescencia

El material biológico fijado en los cubreobjetos generados en los experimentos de infección *in vitro* se tiñó para su análisis mediante inmunofluorescencia directa o indirecta, según el caso, y así observar las bacterias y moléculas/estructuras celulares de interés.

Los anticuerpos primarios (Ab 1^º) y secundarios (Ab 2^º), así como otros marcadores fluorescentes utilizados, se describen en la Tabla 4. En el caso de ensayos de infección para observar la vida intracelular de HiNT en compartimentos subcelulares con pH ácido, se utilizó el marcador fluído *Lysotracker RedDN99* (Invitrogen). Para ello, *Lysotracker RedDN99* 0,5 µM fue añadido a cada pocillo 45 min antes de la fijación de los cubreobjetos.

TABLA 4 Marcadores utilizados para inmunomarcaje específico en el presente trabajo.

Marcador	Tipo	Antígeno/Marcaje	Origen	Dilución	Fuente
cαHiNT	Ab 1 ^º	HiNT	Conejo	1:600	(16)
bαc- Alexa488	Ab 2 ^º	Ab conejo	Burro	1:100	Jackson Inm.
rαLamp1	Ab 1 ^º	Lamp1 (Endosoma tardío)	Ratón	1:75	DSHB
bαr-RRX	Ab 2 ^º	Ab ratón	Burro	1:100	Jackson Inm.
Hoechst 33342	Agente intercalante	ADN	-	1:2500	Molecular Probes
<i>Lysotracker RedDN99</i>	Sonda fluorescente	Compartimentos ácidos	-	-	Invitrogen

*CLAVE: c: conejo, b: burro, r: ratón.

En todos los casos, las tinciones se realizaron en un volumen final de 40 µl PBS1X con 10% suero de caballo, 0,1% saponina y los marcadores y/o anticuerpos correspondientes. Los cubreobjetos se lavaron 2 veces con PBS1X-saponina 0,1%, una vez con PBS1X y se incubaron con los anticuerpos primarios en una cámara oscura y húmeda durante 40 min. Seguidamente, se repitió el proceso para la incubación con los anticuerpos secundarios. A continuación, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS1X-saponina 0,1%, una vez con PBS1X y otra con agua Milli-Q, y se montaron sobre portaobjetos de vidrio con el gel montador *Aqua Poly/Mount* (Polysciences). Las preparaciones montadas se almacenaron en oscuridad a 4°C y se analizaron con un microscopio de fluorescencia Axioskop 2 plus. Las imágenes se tomaron con la cámara AxioCam MRm y se procesaron con el software informático Adobe Photoshop CC 2017 (Adobe Systems Incorporated).

Hibridación fluorescente *in situ*

La hibridación fluorescente *in situ* (*Fluorescent In Situ Hybridization*, FISH) se utilizó para visualizar bacterias metabólicamente activas durante la infección de células epiteliales en cultivo. Este procedimiento se basa en la hibridación del ARN de los ribosomas bacterianos (ARNr) con oligonucleótidos complementarios conjugados con fluorocromos y su posterior procesamiento mediante microscopía de fluorescencia.

Tras la fijación con PFA 3%, los cubreobjetos fueron lavados 3 veces con agua MilliQ e hibridados con oligonucleótidos siguiendo un método previamente descrito (41). Las sondas de ADN EUB338 (5'GCTGCCTCCCGTAGGAGT3') y GAM42a (5'GCCTCCACATCGTTT3'), conjugadas con Cy3 o Alexa 488, fueron diseñadas para marcar específicamente ARNr de Eubacterias y ARNr de Gamma-proteobacterias, respectivamente (42). Ambas sondas se usaron simultáneamente para amplificar la señal fluorescente, a una concentración de 5 nM cada una en tampón de hibridación (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,01% SDS; 0,9 M NaCl; 35% formamida). La hibridación se llevó a cabo en una cámara húmeda a 46°C durante 90 min. Seguidamente, los cubreobjetos se sumergieron en tampón de lavado (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 5 mM EDTA, pH 8; 0,01% SDS; 80 mM NaCl) durante 30 min a 48°C. Tras el lavado, se realizó la tinción fluorescente del ADN y Lamp-1, y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos de vidrio.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)

Se utilizó electroforesis SDS-PAGE para analizar el patrón proteico de una determinada cepa bacteriana. Para ello, se utilizaron extractos celulares completos a partir de bacterias crecidas en placa o en cultivo líquido.

En todos los casos, a no ser que se especifique lo contrario, se emplearon geles con 10% poliacrilamida (fase de resolución). Para la preparación de los extractos proteicos, se utilizaron 100 µl de la suspensión bacteriana de interés a los que se añadió el mismo volumen de tampón de carga 2X (*Loading Buffer*, LB) (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2% p/v, glicerol 10%, DTT 50 mM, azul de bromofenol 0.01% p/v). La muestra se sonicó durante 10 min utilizando un baño de ultrasonidos. Seguidamente, la muestra se calentó a 95°C durante 5 min, y se cargó en el gel previamente preparado. La separación electroforética se realizó con un equipo Mini PROTEAN Tetra System (Bio-Rad).

Para observar el patrón de bandas se realizó una tinción con azul de Coomassie (Bio-Rad), incubando el gel en suave agitación con el producto durante 10 h. A continuación, se lavó el exceso de azul de Coomassie destiñendo el gel durante 3-4 h, en agitación con solución de destinción (metanol 10%, ácido acético 10%). Para conservar el gel destiñado, se mantuvo hidratado en agua MilliQ. Alternativamente, los geles de poliacrilamida con SDS se utilizaron en ensayos de inmunodetección (*western blotting*).

Inmunodetección de proteínas mediante *western blot*

Las muestras a analizar se prepararon y procesaron como se ha descrito anteriormente. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa mediante el sistema de transferencia húmeda *Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad). Se aplicó un voltaje de 10V durante 35 min, y se comprobó la eficiencia del proceso de transferencia con la solución Ponceau S (Sigma-Aldrich). Seguidamente, la membrana se bloqueó con una solución de leche en polvo 4% en TBS1X-Tween 20 0,1% (*Tris-buffered saline*: 50 mM Tris-Cl, pH 7,5; 150 mM NaCl) durante 1 h. A continuación, se realizaron 3 lavados consecutivos de la membrana durante 5 min en TBS1X-Tween 20 0,1%. La proteína Hmw1A se detectó incubando la membrana con el anticuerpo primario cobaya anti-HmwA (gp85) (43) diluido 1:2000 en TBS1X-Tween 20 0,1% leche 4% (p/v) durante 4 h, a 4°C y en agitación. Seguidamente, se realizaron 3 lavados de 5 min/lavado en TBS1X y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario cabra anti-cobaya IgG conjugado con peroxidasa de rábano (Santa Cruz), diluido 1:5000 en TBS1X 4% leche (p/v) durante 1 h a Tª ambiente. Las membranas se revelaron con el kit *ECL Advance Western Blotting Detection Kit* (GE HealthCare).

Análisis de los niveles de expresión de genes bacterianos

La cuantificación del ARN mensajero (ARNm) bacteriano se utilizó para medir los niveles de expresión de un panel de genes de interés en diferentes cepas de *H. influenzae*.

Extracción de ARN bacteriano

Se prepararon pre-inóculos de las cepas de interés, que se emplearon para inocular 50 ml de sBHI en un matraz de 250 ml, diluyendo el pre-inóculo a DO₆₀₀ = 0,07. Los cultivos se crecieron en agitación (200 r.p.m.) a 37°C con 5% CO₂ hasta alcanzar DO₆₀₀ = 0,4-0,5. Siete ml de cada cultivo fueron centrifugados a 3.500 r.p.m. durante 3 min, a 4°C. Inmediatamente, el *pellet* resultante se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó un máximo de 24 h a -80°C previo a su procesamiento. Se realizó una extracción del ARN total bacteriano utilizando el método Trizol (44).

Análisis de la calidad del ARN

Una vez se extrajo el contenido total de ARN de las cepas de interés, se midió su concentración y la relación de absorbancias 260nm/230nm de las muestras con un equipo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Con estos valores, se ajustó la concentración de ARN de las muestras a 200 ng/µl con agua comercial (Sigma-Aldrich) y se evaluó su calidad usando *RNA 600 Nano LabChips* y un equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer*. En todos los casos, se obtuvo material no degradado, ARN de alta calidad, con los ARN ribosomales (ARNr) 16S y 23S intactos.

Retrotranscripción

Se utilizó 1 ng del ARN total extraído para sintetizar 1000 ng de ADN complementario (ADNc). Para la retrotranscripción, se empleó el kit *PrimeScript RT Reagent Kit* (TaKaRa) siguiendo las instrucciones del fabricante.

PCR cuantitativa a tiempo real

Para la PCR cuantitativa a tiempo real (*quantitative PCR*, qPCR) se utilizaron los reactivos *Luminaris HiGreen qPCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) y un equipo *AriaMx Realtime PCR System* (Agilent). Los cebadores utilizados se diseñaron con el software Primer3 (bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0). Los cebadores utilizados fueron: hmw1A_F (TGTATCACTAAATGGAAGTGGTAGAGG); hmw1A_R (CCCTGGCGATGAAAATAAGA); hmw2A_F (ATCCCATGTTCCGAAGGATA); hmw2A_R (AATTTTGCCACCAAGAGTG); hmw2A_F_NP (TCTGTTTTAGCGAGCGGTTT); hmw2A_R_NP (GAATACGGCGAGTTGTTGT); 16S_qPCR_F (GGCGTTGATGACCGTGAAC); 16S_qPCR_R (GCCAGTAATAATCGCCCTTCTAG). Las condiciones de reacción fueron; desnaturalización inicial (3 min; 95°C); 45 ciclos de desnaturalización (10 s; 95°C) + anillamiento (30 s; 55°C); curvas de disociación (incremento de 65°C a 95°C, 0,5°C cada 5 s).

Con los resultados obtenidos, se determinaron las cantidades relativas de ARNm determinando el ciclo umbral (Ct) en cada caso. El Ct de cada gen se normalizó utilizando el valor Ct del gen ARNr 16S (ARNr 16S), como control endógeno. En cada caso, el valor de expresión normalizado se calculó como $2^{-\Delta Ct} \cdot 100$, siendo ΔCt la diferencia entre el Ct del ARNm de un gen concreto y el Ct del gen ARNr 16S ($Ct_{unknown} - Ct_{16S}$). Para cada cepa de *H. influenzae* se realizaron como mínimo dos extracciones de ARN independientes, realizándose las qPCR por triplicado ($n \geq 6$).

Análisis estadístico

En todos los casos se utilizó el *software* informático GraphPad Prism 6 para elaborar el análisis estadístico y las representaciones gráficas. Los resultados están expresados como la media \pm la desviación estándar. Las barras de error de las gráficas corresponden al error típico. La igualdad de los resultados se contrastó a partir de un análisis de la varianza (ANOVA) de una cola o el test t de Student de dos colas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuyo el valor de P (*P-value*) fue inferior a 0,05.

REFERENCIAS

1. Mathers CD, Loncar D, Boreham J, Thun M, Heath J, Doll R. Projections of Global Mortality and Burden of Disease from 2002 to 2030. *Samet J, editor. PLoS Med.* 28 de noviembre de 2006;3(11):e442.
2. Celli BR, MacNee W, ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J.* junio de 2004;23(6):932-46.
3. Seemungal TA, Dolandson GC, Bhowmik A, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Time Course and Recovery of Exacerbations in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* mayo de 2000;161(5):1608-13.
4. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 17 de mayo de 1997;349(9063):1436-42.
5. Murphy TF, Sethi S, Klingman KL, Brueggemann AB, Doern GV. Simultaneous Respiratory Tract Colonization by Multiple Strains of Nontypeable *Haemophilus influenzae* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Implications for Antibiotic Therapy. *J Infect Dis.* agosto de 1999;180(2):404-9.
6. Foxwell AR, Kyd JM, Cripps AW. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: pathogenesis and prevention. *Microbiol Mol Biol Rev.* junio de 1998;62(2):294-308.
7. Rao VK, Krasan GP, Hendrixson DR, Dawid S, St Geme JW. Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiol Rev.* abril de 1999;23(2):99-129.
8. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev.* abril de 2000;13(2):302-17.
9. Sethi S, Murphy TF. Infection in the Pathogenesis and Course of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med.* 27 de noviembre de 2008;359(22):2355-65.
10. Smaldone GC, Foster WM, O'Riordan TG, Messina MS, Perry RJ, Langenback EG. Regional impairment of mucociliary clearance in chronic obstructive pulmonary disease. *Chest.* mayo de 1993;103(5):1390-6.
11. Marstrand BJ, Gollwitzer ES. Host-microorganism interactions in lung diseases. *Nat Rev Immunol.* 25 de noviembre de 2014;14(12):827-35.
12. Garmendia J, Morey P, Bengoechea JA. Impact of cigarette smoke exposure on host-bacterial pathogen interactions. *Eur Respir J.* 1 de febrero de 2012;39(2):467-77.
13. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 de marzo de 2017;195(5):557-82.
14. Carlet J, Rambaud C, Pulcini C. Save Antibiotics: a call for action of the World Alliance Against Antibiotic Resistance (WAAAR). *BMC Infect Dis.* 28 de noviembre de 2014;14(1):436.
15. Barnes PJ. Corticosteroid resistance in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* marzo de 2013;131(3):636-45.
16. Morey P, Cano V, Marti-Llitas P, Lopez-Gomez A, Regueiro V, Saus C, et al. Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypeable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. *Microbiology.* 1 de enero de 2011;157(1):234-50.
17. Ahearn CP, Gallo MC, Murphy TF. Insights on persistent airway infection by non-typeable *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Pathog Dis.* 1 de junio de 2017;75(4).
18. Mehta SK, Plaut AG, Calvanico NJ, Tomasi TB. Human Immunoglobulin A: Production of an Fc Fragment by an Enteric Microbial Proteolytic Enzyme. *J Immunol.* 1973;111(4).
19. Plaut AG, Gilbert J V, Artenstein MS, Capra JD. Neisseria gonorrhoeae and neisseria meningitidis: extracellular enzyme cleaves human immunoglobulin A. *Science.* 12 de diciembre de 1975;190(4219):1103-5.
20. Spahich NA, St Geme JW, III. Structure and function of the *Haemophilus influenzae* autotransporters. *Front Cell Infect Microbiol.* 2011;1:5.
21. Hendrixson DR, St Geme JW. The *Haemophilus influenzae* Hap serine protease promotes adherence and microcolony formation, potentiated by a soluble host protein. *Mol Cell.* diciembre de 1998;2(6):841-50.
22. Barenkamp SJ, Leininger E. Cloning, expression, and DNA sequence analysis of genes encoding nontypeable *Haemophilus influenzae* high-molecular-weight surface-exposed proteins related to filamentous hemagglutinin of Bordetella pertussis. *Infect Immun.* 1 de abril de 1992;60(4):1302-13.
23. Hultgren SJ, Abraham S, Caparon M, Falk P, St Geme JW, Normark S. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell.* 4 de junio de 1993;73(5):887-901.
24. St Geme JW, Falkow S, Barenkamp SJ, Barenkamp SJ. High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate attachment to human epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 de abril de 1993;90(7):2875-9.
25. Mell JC, Viadas C, Moleres J, Sinha S, Fernández-Calvet A, Porsch EA, et al. Transformed Recombinant Enrichment Profiling Rapidly Identifies HMW1 as an Intracellular Invasion Locus in *Haemophilus influenzae*. *Salama NR, editor. PLOS Pathog.* 28 de abril de 2016;12(4):e1005576.
26. Barenkamp SJ, St Geme JW. Genes encoding high-molecular-weight adhesion proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* are part of gene clusters. *Infect Immun.* agosto de 1994;62(8):3320-8.
27. Grass S, Lichti CF, Townsend RR, Gross J, St. Geme JW, III JSG. The *Haemophilus influenzae* HMW1C Protein Is a Glycosyltransferase That Transfers Hexose Residues to Asparagine Sites in the HMW1 Adhesin. *Stebbins CE, editor. PLoS Pathog.* 27 de mayo de 2010;6(5):e1000919.
28. Dawid S, Barenkamp SJ, St Geme JW. Variation in expression of the *Haemophilus influenzae* HMW adhesins: a prokaryotic system reminiscent of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 de febrero de 1999;96(3):1077-82.
29. Cholon DM, Cutter D, Richardson SK, Sethi S, Murphy TF, Look DC, et al. Serial Isolates of Persistent *Haemophilus influenzae* in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Express Diminishing Quantities of the HMW1 and HMW2 Adhesins. *Infect Immun.* 1 de octubre de 2008;76(10):4463-8.
30. Garmendia J, Marti-Llitas P, Moleres J, Puig C, Bengoechea JA. Genotypic and phenotypic diversity of the noncapsulated *Haemophilus influenzae*: adaptation and pathogenesis in the human airways. *Int Microbiol.* diciembre de 2012;15(4):159-72.
31. Clementi CF, Murphy TF. Non-typeable *Haemophilus influenzae* invasion and persistence in the human respiratory tract. *Front Cell Infect Microbiol.* 2011;1:1.
32. Fink DL, Buscher AZ, Green B, Fernsten P, St Geme JW. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-terminal end of the passenger domain. *Cell Microbiol.* marzo de 2003;5(3):175-86.
33. St. Geme JW, Falkow S. A *Haemophilus influenzae* IgA protease-like protein promotes intimate interaction with human epithelial cells. *Mol Microbiol.* 1 de octubre de 1994;14(2):217-33.
34. Garcia-Boronat M, Diez-Rivero CM, Reinherz EL, Reche PA. PVS: a web server for protein sequence variability analysis tuned to facilitate conserved epitope discovery. *Nucleic Acids Res.* 1 de julio de 2008;36(Web Server issue):W35-41.
35. Sethi S. Bacteria in Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Phenomenon or Epiphenomenon? *Proc Am Thorac Soc.* 1 de abril de 2004;1(2):109-14.
36. Chin CL, Manzel LJ, Lehman EE, Humlicek AL, Shi L, Starner TD, et al. *Haemophilus influenzae* from Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Exacerbation Induce More Inflammation than Colonizers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 de julio de 2005;172(1):85-91.
37. Sethi S, Evans N, Grant BJB, Murphy TF. New Strains of Bacteria and Exacerbations of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N Engl J Med.* 15 de agosto de 2002;347(7):465-71.
38. Murphy TF, Brauer AL, Schiffmacher AT, Sethi S. Persistent Colonization by *Haemophilus influenzae* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 de agosto de 2004;170(3):266-72.
39. Euba B, Moleres J, Viadas C, Ruiz de los Mozos I, Valle J, Bengoechea JA, et al. Relative Contribution of P5 and Hap Surface Proteins to Nontypeable *Haemophilus influenzae* Interplay with the Host Upper and Lower Airways. *Tregoning JS, editor. PLoS One.* 20 de abril de 2015;10(4):e0123154.



40. López-Gómez A, Cano V, Moranta D, Morey P, García del Portillo F, Bengoechea JA, et al. Host cell kinases, $\alpha 5$ and $\beta 1$ integrins, and Rac1 signalling on the microtubule cytoskeleton are important for non-typable *Haemophilus influenzae* invasion of respiratory epithelial cells. *Microbiology*. 1 de septiembre de 2012;158(Pt 9):2384-98.
41. Neef A, Zaglauer A, Meier H, Amann R, Lemmer H, Schleifer KH. Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. *Appl Environ Microbiol*. diciembre de 1996;62(12):4329-39.
42. Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer K-H. Phylogenetic Oligodeoxynucleotide Probes for the Major Subclasses of Proteobacteria: Problems and Solutions. *Syst Appl Microbiol*. diciembre de 1992;15(4):593-600.
43. Buscher AZ, Grass S, Heuser J, Roth R, St Geme JW. Surface anchoring of a bacterial adhesin secreted by the two-partner secretion pathway. *Mol Microbiol*. julio de 2006;61(2):470-83.
44. Toledo-Arana A, Dussurget O, Nikitas G, Sesto N, Guet-Revillet H, Balestrino D, et al. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature*. 18 de junio de 2009;459(7249):950-6.