



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Estudio de la síntesis de pirocianina por los operones reiterados *phzA1-G1* y *phzA2-G2* de *Pseudomonas aeruginosa* ID4365

Tesis

Que para obtener el título de Licenciado en Biología

PRESENTA

René Hernández Estrada

TUTOR:

Dr. Miguel Cocotl Yañez

Miembros del comité asesor

Dr. Erasmo Negrete Abascal
Dra. Irma Elena Dueñas García
Dr. Juan Alberto Ponciano Gómez
Mtra. Emelia Campoy Otero



Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 BIOLOGÍA DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	3
1.1.1 LOS SISTEMAS SENSORES DE QUÓRUM O “ <i>QUORUM-SENSING</i> ”	5
1.1.2 LOS SISTEMAS QS EN <i>P. AERUGINOSA</i>	6
1.2 FENAZINAS	9
1.2.1 LA PIOCIANINA	10
1.2.2 BIOSÍNTESIS.....	12
1.2.3 REGULACIÓN	13
2 ANTECEDENTES	16
3 HIPÓTESIS	20
4 OBJETIVOS	20
4.1 GENERAL:.....	20
4.2 PARTICULARES:.....	20
5 MATERIAL Y MÉTODOS	20
5.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y MEDIOS DE CULTIVO.	20
5.2 MANIPULACIÓN DE ADN	21
5.3 GENERACIÓN DE LAS MUTANTES EN LOS OPERONES <i>PHZA1-G1</i> Y <i>PHZA2-G2</i>	25
5.4 PROTOCOLO DE CUANTIFICACIÓN DE PIOCIANINA	27
5.5 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	27
6 RESULTADOS	28
6.1 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PEXTCZ1R Y PEXSMZ2R.....	28
6.2 VERIFICACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PEXTCZ1R Y PEXSMZ2R.....	30
6.3 GENERACIÓN DE LAS MUTANTES SENCILLAS <i>IDΔPHZ1::TC</i> , <i>IDΔPHZ2::SM</i> Y LA DOBLE MUTANTE <i>IDΔPHZS</i> EN <i>P. AERUGINOSA</i> ID4365.	33
6.4 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PIOCIANINA EN LB Y PPGAS A 30 °C.....	36
6.5 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PIOCIANINA EN LB Y PPGAS A 37 °C.....	41
7 DISCUSIÓN	46
8 CONCLUSIONES	49
9 PERSPECTIVAS	50
10 BIBLIOGRAFIA	50

El presente proyecto fue apoyado por el Programa de Apoyo a
Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)
IA203519 y FORDECYT-PRONACES 53366.

Agradecimientos

Este proyecto de investigación se llevó a cabo en el departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM y en el laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología #7 del Instituto de Investigaciones Biomédicas bajo la tutoría del Doctor Miguel Cocotl Yañez.

Agradezco haber sido apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por financiar este proyecto con la beca IA203519 y a CONACYT por su financiamiento con la beca de Ayudante de Investigador Nacional Nivel III o emérito.

Muchas gracias a la doctora Gloria Soberón Chávez y a la Maestra en Ciencias Alejandra Abigail González Valdez por sus consejos durante la realización de este proyecto.

Mis agradecimientos al jurado conformado por el doctor Erasmo Negrete Abascal, la doctora Irma Elena Dueñas García, al doctor Juan Alberto Ponciano Gomez y a la maestra Emelia Campoy Otero por sus valiosos consejos.

...
mi mayor gratitud

Mamá, por mostrar con el ejemplo lo que el camino de la disciplina y la constancia significan en la vida. Gracias por estar conmigo en esta y cada etapa de mi vida...

Papá, por tu compromiso, a pesar y gracias a las miles de circunstancias de la vida...

Dr. Miguel, Gracias por tus enseñanzas, tu tanta paciencia... por ser un gran amigo y un excelente maestro todos los días. Gracias por no rendirte y no dejar que me rindiera en nada...

A Karen, por ir con... y en contra de tu naturaleza, siempre con el objetivo de mejorar constantemente...

A ustedes... Martín, Selene, Fernando... por ayudarme a comprender la ciencia, por el montón de bromas ácidas, y por compartir grandes momentos conmigo...

A Weely y Paola, mis mejores amigos durante esta etapa, por todas las ocasiones que estuvieron ahí...

“Gracias”

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria que pertenece al grupo de las Gram negativas. Conocida por su rol como patógeno oportunista en el ser humano, esta bacteria se caracteriza por una amplia distribución en la naturaleza y por la extensa variedad de factores de virulencia que produce, entre los que destaca la piocianina. La piocianina es un zwitterion con actividad redox, lo que permite la formación de especies reactivas de oxígeno y consecuentemente la generación de daño oxidativo en otras células, incluyendo células eucariotas. Se ha determinado que la biosíntesis de piocianina en *P. aeruginosa* se da a través de los operones reiterados *phzA1B1C1D1E1F1G1* (*phzA1-G1*) y *phzA2B2C2D2E2F2G2* (*phzA2-G2*). Así mismo, se ha documentado que los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* poseen regiones reguladoras diferentes, sugiriendo una posible regulación diferencial dependiente de estímulos metabólicos y ambientales. El estudio del aporte de cada operón en la síntesis de piocianina ha sido reportado previamente utilizando como modelo de estudio la cepa PAO1 y la cepa PA14. En la cepa PAO1 ambos operones aportan de la misma forma en la síntesis de piocianina, manteniendo así un estado de homeostasis. Por otro lado, en la cepa PA14, el operón *phzA2-G2* es aquel que aporta más en la biosíntesis de piocianina. Estos datos sugieren que, aunque ambas cepas poseen los dos operones, la expresión y el aporte de cada uno de ellos es diferente a pesar de que la identidad en la secuencia nucleotídica entre ellas es superior al 98%.

En el presente estudio se evaluó la aportación de los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* en la producción de piocianina en la cepa *P. aeruginosa* ID4365, un aislado ambiental perteneciente al mismo clado de la cepa PA14, pero que presenta una sobreproducción de piocianina. Con el objetivo de determinar la aportación en la síntesis de piocianina, se construyeron mutantes sencillas en cada uno de los operones, tanto *phzA1-G1* como *phzA2-G2*, así como una doble mutante en ambos operones y se evaluó su capacidad de producir esta fenazina en dos medios diferentes a dos temperaturas. Los resultados obtenidos indican que las mutantes

sencillas crecidas en medio LB a 37 °C aportan de la misma forma en la síntesis de piocianina, tal como ha sido reportado en la cepa de referencia PAO1; sin embargo, la producción de piocianina a 30 °C se ve aumentada en la mutante en el operón *phzA1-G1* sugiriendo que hay una mayor expresión del operón *phzA2-G2* en estas condiciones. Por otro lado, el operón *phzA1-G1* es el que aporta en mayor medida cuando esta cepa es crecida en medio PPGAS a una temperatura de 30 y 37 °C, lo cual contrasta con lo reportado en la cepa PA14 cuya aportación recae principalmente en el operón *phzA2-G2*. Por lo tanto, la aportación de los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* a la síntesis de piocianina varía según la cepa y las condiciones de crecimiento, reflejando así su gran capacidad adaptativa.

1 Introducción

1.1 Biología de *Pseudomonas aeruginosa*

La implicación de *Pseudomonas aeruginosa* en enfermedades del ser humano fue reconocida por primera vez en 1882 cuando el farmacéutico Carle Gessard logró aislar este patógeno de vendajes teñidos de color azul-verdoso (Gessard 1884). Actualmente, *P. aeruginosa* es conocida por ser uno de los miembros más importantes del grupo de las gamma-proteobacteria. Su amplia distribución en ambientes terrestres, acuáticos e incluso tejidos de plantas y animales (Goldberg., 2000) ha originado gran diversidad de cepas. A pesar de ser una bacteria típica de vida libre se ha reportado que *P. aeruginosa* infecta levaduras (Hogan & Kotler., 2002), nemátodos (Mahajan *et al.*, 1999), insectos (Jander *et al.*, 2000), plantas (Rahme *et al.*, 1995) y mamíferos (Hammer *et al.*, 2003). Asimismo, esta bacteria es conocida por ser un patógeno oportunista en seres humanos. Su capacidad de colonizar tejidos externos, como la piel y la córnea, hasta los tejidos internos del tracto urinario y el sistema respiratorio (Bodey *et al.*, 1983) ha hecho que esta bacteria sea una de las principales causas de sepsis en individuos con quemaduras graves (Rumbaugh *et al.*, 1999), cáncer (Bergen & Shelhamer., 1996) y SIDA (Dropulic *et al.*, 1995). Además de causar la pérdida progresiva de la función pulmonar en pacientes con fibrosis quística (Spliker *et al.*, 2004), *P. aeruginosa* se posiciona como la principal causa de infecciones nosocomiales en pacientes hospitalizados, de las cuales es responsable de la muerte del 80% de ellos (Richards *et al.*, 1999; Eklof *et al.*, 2019). En México se ha reportado gran cantidad de casos cuyas infecciones causadas por cepas clínicas y ambientales de *P. aeruginosa* ya han provocado múltiples decesos y consecuentemente alarmas sanitarias, esto principalmente dado por la multiresistencia natural a los antibióticos y la habilidad de establecerse de forma permanente en el organismo (OMS., 2019; Venturi *et al.*, 2006).

Existen varios elementos que contribuyen a la patogenicidad de *P. aeruginosa*. En primer lugar, como miembro de la familia Pseudomonadaceae, esta bacteria presenta una amplia versatilidad metabólica. Por lo cual, posee múltiples estrategias de supervivencia, como la capacidad de usar diferentes compuestos orgánicos como fuente de energía y carbono (Palleroni., 1984) o presentar crecimiento en condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Eschbach *et al.*, 2004). Como resultado de lo anterior, los requisitos nutricionales son relativamente simples beneficiando así la persistencia en instrumentos de uso básico en los hospitales como catéteres, dispositivos respiratorios, válvulas cardíacas, soluciones antisépticas débiles e incluso en agua destilada, (Brewer *et al.*, 1996; Hardalo & Edberg., 1997). Otra estrategia desarrollada por *P. aeruginosa* son los múltiples mecanismos intrínsecos de resistencia a los antimicrobianos. Entre ellos destaca la baja permeabilidad de su membrana extracelular, la capacidad de expresar beta-lactamasas y la presencia de bombas de eflujo. Estos mecanismos le proveen una resistencia intrínseca a una variedad considerable de agentes antimicrobianos, la cual puede ampliarse a través de mutaciones que deriven en resistencia a nuevos antibióticos (Livermore., 2001). Todo lo anterior tiene como consecuencia que el tratamiento contra *P. aeruginosa* no sea fácil y que derive en el surgimiento de cepas multiresistentes.

Finalmente, *P. aeruginosa* cuenta con una gran cantidad de factores de virulencia que son sintetizados en respuesta a diversos estímulos (Lee *et al.*, 2006; Balasubramanian *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2016). Algunos, como lectinas y pili tipo IV asociados a la célula o proteasas (elastasas LasA y LasB), surfactantes (ramnolípidos) y pigmentos bactericidas (piocianina) secretados al medio extracelular juegan un papel crucial en defensa contra potenciales competidores, como hongos y otras bacterias (Drenkard *et al.*, 2003). De esta forma, la acción acumulativa de los diferentes factores de virulencia es clave detrás de la patogenicidad de esta bacteria (Lee *et al.*, 2006).

1.1.1 Los sistemas sensores de quórum o “*Quorum-Sensing*”

La mayor parte de la regulación génica en bacterias está envuelta en un sistema de comunicación célula-célula, dada a través de la síntesis y reconocimiento de moléculas señal. El sistema de comunicación, denominado “*Quorum-Sensing*” (QS), permite a la bacteria monitorear su densidad poblacional y responder a la concentración extracelular de esa molécula señal (Bassler, 2002). La concentración de la molécula señal aumenta a la par del aumento de la densidad poblacional bacteriana. Al alcanzar una concentración crítica, la molécula señal promueve la alteración de la expresión de genes blanco al activar a un regulador de la respuesta. Así mismo, la respuesta a la densidad celular provee ventajas adicionales, como el mejoramiento de la defensa contra microorganismos competidores o al facilitar el establecimiento en diversos nichos. Se sabe que el sistema QS en bacterias regula la expresión de genes relacionados con la síntesis de factores de virulencia, esporulación, formación de “*biofilm*”, “*swarming*”, “*swimming*”, biosíntesis de antibióticos y bioluminiscencia (Fuqua *et al.*, 1994; Venturi., 2005).

En bacterias Gram-negativas, la molécula señal del sistema QS más común es una acil-homoserina lactona (AHL). Descrita por primera vez en la bacteria bioluminiscente *Vibrio fischeri*, se determinó que la producción de bioluminiscencia en esta bacteria es regulada por el sistema QS y la molécula señal AHL (Ruby, 1996). El arquetipo del sistema QS de *V. fischeri* está mediado, básicamente, por dos proteínas pertenecientes a la familia LuxI-LuxR (Fuqua *et al.*, 2001; Whitehead *et al.*, 2001). Las proteínas tipo LuxI son las enzimas citoplasmáticas responsables de la síntesis de AHL, que al acumularse de manera intracelular y extracelular en concentraciones críticas interacciona con proteínas tipo LuxR, el complejo LuxR-AHL puede unirse a secuencias específicas, conocidas como cajas *lux* ubicadas en el promotor de genes regulados por QS, afectando así la expresión. Entre los sistemas QS más estudiados se encuentra el sistema TraI/TraR que controla la conjugación de los plásmidos en *Agrobacterium tumefaciens*, el sistema CarI/CarR que regula la producción de antibióticos y exoenzimas en *Erwiana cartovora* y los sistemas LasI/LaR, RhII/RhIR y PqsR/HHQ o PQS que controlan la formación de

“*biofilm*” y la producción de factores de virulencia en *P. aeruginosa* (Fuqua *et al.*, 2001; Whitehead *et al.*, 2001; von Bodman *et al.*, 2003; Smith & Iglewski., 2003; Lazdunski *et al.*, 2004)

1.1.2 Los sistemas QS en *P. aeruginosa*

Existen tres sistemas QS estructurados de forma jerárquica que convergen en *P. aeruginosa*. Los sistemas son capaces de mantener estados de homeostasis y dar múltiples respuestas ante el medio, esto gracias a la regulación transcripcional de un estimado de 315 genes (6% del genoma). Denominados Las, Rhl y Pqs, los tres sistemas se encuentran estrechamente conectados y son regulados a través de sus moléculas señal (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003).

El sistema Las, cuyo factor transcripcional LasR interacciona con el autoinductor N-3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona (C₁₂), producido por la sintasa LasI, formando el complejo LasR/C₁₂. Este complejo promueve la transcripción de los genes *lasB*, *lasI*, *rhIR*, *rhII*, *pqsH* y *pqsR* que forman parte de los sistemas Rhl y Pqs (Gilbert *et al.*, 2009; De Kievit *et al.*, 2002). Así mismo, el complejo LasR/C₁₂ induce la transcripción de *rsaL*, un gen integrado en el sistema Las que codifica para el regulador transcripcional global RsaL (de Kievit *et al.*, 1999). RsaL reprime de forma directa la transcripción de múltiples genes, incluido *lasI*, ejerciendo así un efecto homeostático en la producción de la molécula señal C₁₂, confiriendo una mejor respuesta en la expresión de genes regulados por el sistema Las (Rampioni *et al.*, 2006, 2007; Bertani *et al.*, 2007). Los genes *rhIR* y *rhII*, activados por el complejo LasR/C₁₂, codifican para el factor transcripcional RhIR y la sintasa RhII. La sintasa RhII produce el autoinductor N-butanoil-homoserinalactona (C₄) el cual, unido a RhIR forma el complejo RhIR/C₄ que a su vez activa la transcripción de genes que sintetizan factores de virulencia como: *rhlAB* (ramnolípidos), *lecA* (lectina), *hcnABC* (ácido cianhídrico), *phzM* (piocianina), y los operones reiterados *phzA1-G1* y *phzA2-G2* (síntesis de fenazinas) (Medina *et al.*, 2003). Asimismo, el complejo RhIR/C₄ sirve como regulador negativo en la transcripción de *pqsR* y *pqsH* e impide la

traducción de *pqsA*, genes cruciales para la activación del sistema Pqs (Wade *et al.*, 2005).

El tercer sistema denominado *Pseudomonas quinolone signal* (Pqs) es más complejo que los sistemas Las y RhlR, debido a que múltiples enzimas, codificadas por el operón *pqsABCDE*, producen más de 50 alquil-4-quinolonas (AQ), de las cuales, 2-heptil-4-hidroxiquinolona (HHQ), es convertida en 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) por la mono-oxigenasa PqsH. Ambas moléculas señal, PQS y HHQ, pueden unirse y activar al regulador transcripcional PqsR (también conocido como MvfR). Los complejos PqsR/HHQ o PqsR/PQS pueden unirse a la región promotora del operón *pqsABCDE* incrementando su transcripción y generando un efecto de autorregulación positiva que aumenta la producción de AQs e incrementando la expresión de *pqsE*, codificado por el último gen estructural del operón *pqsABCDE* (Heeb *et al.*, 2011; Dulcey *et al.*, 2013). PqsE es una tioesterasa involucrada en la biosíntesis de AQs (Drees & Fetzner, 2015). Esta proteína controla de manera indirecta la expresión de múltiples factores de virulencia, aún en ausencia de las AQs. Sin embargo, el mecanismo por el cual PqsE influye sobre los genes blanco regulados por los sistemas QS sigue siendo desconocido (García-Reyes *et al.*, 2020; Hazan *et al.*, 2010; Rampioni *et al.*, 2010, 2016). Por lo anterior, se ha determinado que la integración de los sistemas QS en circuitos adicionales permite a la bacteria incrementar el rango de estímulos a los que responde.

Se ha determinado que los sistemas QS en *P. aeruginosa* poseen una estructura jerárquica (Fig.1). En medio de crecimiento rico, es generalmente aceptado que el sistema Las es el primero en activarse, permitiendo la posterior activación de los sistemas Rhl y Pqs (Pesci *et al.*, 1997; de Kievit *et al.*, 2002; Gallagher *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha determinado que durante la fase estacionaria tardía el sistema Rhl puede activarse en ausencia del sistema Las (Dekimpe & Deziel, 2009). El factor transcripcional RhlR es esencial para la producción de factores de virulencia como la elastasa, los ramnolípidos y la piocianina pero tiene un impacto negativo en el sistema Pqs al reprimir la producción de la molécula señal

PQS, a través de la interferencia de la expresión de *pqsR* y *pqsABCDE*. Por otro lado, el sistema Pqs presenta un efecto positivo sobre el sistema Rhl (*McKnight et al.*, 2000; *Wade et al.*, 2005; *Xiao et al.*, 2006; *Brownwer et al.*, 2014). Al agregar PQS a los cultivos de *P. aeruginosa*, se ha observado un incremento en los niveles de RhlR y C₄, mostrando una fuerte correlación entre estos dos sistemas (*McKnight et al.*, 2000; *Diggle et al.*, 2003).

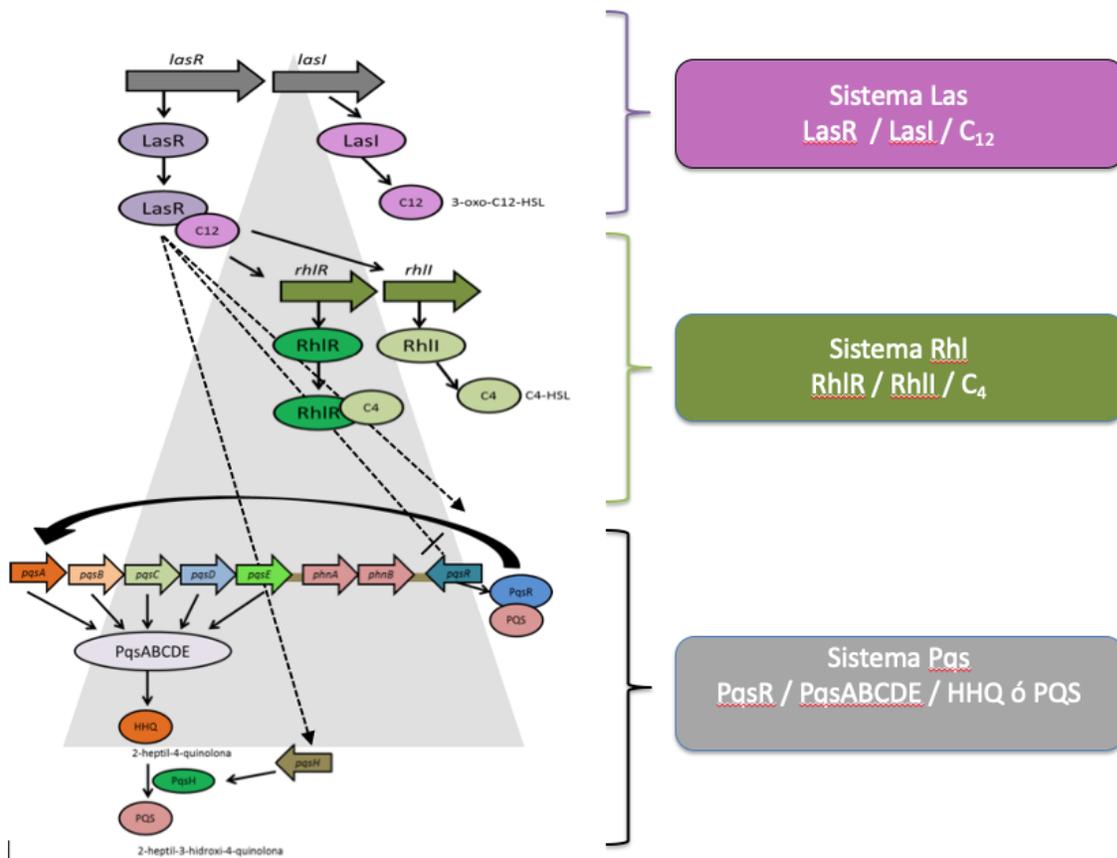


Figura 1. Esquema de la cascada de regulación de los tres sistemas de QS. En esta visión tradicional de QS, el sistema Las se propone como el regulador principal ya que ejerce influencia en los otros dos sistemas. De esta manera el complejo LasR/C₁₂ regula a *lasI*, *rhIR*, *rhII* y *pqsR* además de los genes pertenecientes a su regulación.

1.2 Fenazinas

Las fenazinas han recibido especial atención dentro del campo de la investigación por su amplio rango de propiedades, ya sea como precursores para el desarrollo de compuestos antitumorales (Pierson & Pierson 2010), o como agentes de control biológico (Guo *et al.*, 2017). Desde el punto de vista biotecnológico, las fenazinas constituyen uno de los grupos más importantes debido a sus características fisicoquímicas tal como sus propiedades oxido-reductoras, pigmentación, y la capacidad de cambiar su color dependiendo del pH y el estado redox, por lo cual las fenazinas y sus derivados han sido empleadas como indicadores colorimétricos. Recientemente, la explotación industrial de las fenazinas ha originado derivados que sirven como sensores ambientales y/o biosensores en el área de la nanotecnología. Por ejemplo, Ryazanova *et al.*, (2007) han reportado un sensor basado en luminiscencia, desarrollado a partir de un derivado de las fenazinas. Además, Jeykumari & Narayanan (2007) desarrollaron un sensor amperimétrico de monitoreo para H₂O₂. Así mismo, experimentos realizados en pilas de combustible microbianas (PCM), que emplean microorganismos para realizar la catálisis de energía química a energía eléctrica, han demostrado que la incorporación de piocianina en la PCM resulta en la amplificación del rango de la transferencia de electrones, elevando la eficiencia de la transferencia de electrones a los ánodos del electrodo (Rabaey *et al.*, 2005; Pham *et al.*, 2008). Por otro lado, se ha determinado que los derivados de las fenazinas presentan actividad antitumoral (Mavrodi *et al.*, 2006). Las células que respiran activamente, tal como las células tumorales, son más vulnerables a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) así como a la interferencia en la respiración producida por las fenazinas. Debido a que algunos derivados de las fenazinas interfieren con la actividad de la topoisomerasa I y II en células eucariontes, las células que exhiben niveles elevados de ambas topoisomerasas, como las células cancerosas, son particularmente susceptibles a interferencias por fenazinas. (Mavrodi *et al.*, 2006; Bilal *et al.*, 2017). No obstante, la piocianina se ha convertido en una de las fenazinas más estudiadas debido a su capacidad como factor de virulencia en infecciones humanas (Lau *et al.*, 2004).

1.2.1 La piocianina

En contraste con otras bacterias patógenas, el genoma de las cepas clínicas y ambientales de *P. aeruginosa* se encuentra altamente conservado (Grosso-Becerra *et al.*, 2014). Se ha determinado que, al igual que las cepas clínicas, los aislados ambientales son capaces de sintetizar productos virulentos para el ser humano, por lo cual son catalogados como agentes altamente patógenos (Pirnay *et al.*, 2009). De esta forma, la eficiencia en la producción y secreción de múltiples factores de virulencia, regulados a nivel transcripcional por el sistema QS, determina la patogenicidad de esta bacteria (Williams & Cámara, 2009). Entre los factores de virulencia más estudiados destaca la 5-metilfenazin-1-ona o piocianina, metabolito secundario que en estado oxidado confiere el pigmento azul-verdoso característico de las colonias de esta especie. Dicho metabolito pertenece al grupo de las fenazinas, el cual designa aquellos compuestos heterocíclicos nitrogenados con funciones tan diversas como antibióticos y/o como agentes intercalantes en el ADN, lo cual les otorga un alto nivel de importancia fisiológica (Lau *et al.*, 2004).

Durante su estado reducido, la piocianina puede reaccionar con el oxígeno libre presente en los pulmones afectando varias funciones celulares. Esto, debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Britigan *et al.*, 1997). Estudios *in vitro* han indicado que este mecanismo inhibe la respiración celular, función ciliar, crecimiento de células epidérmicas y liberación de prostaciclina (Sorensen *et al.*, 1987; Kamath *et al.*, 1995). Asimismo, la piocianina tiene la capacidad de interrumpir la homeostasis de calcio e inducir apoptosis de neutrófilos (Denning *et al.*, 1998). Todo esto sumado favorece la invasión de tejidos, promueve el establecimiento de la enfermedad y, por consecuencia, contribuye a la virulencia.

Se ha determinado que la piocianina afecta a pacientes con fibrosis quística, este padecimiento surge a partir de la mutación genética en el regulador de la conductancia transmembranal (CFTR), cuya función es mediar el transporte del ion cloro (Cl⁻). La mutación más común en el CFTR ($\Delta F508$) muestra niveles bajos de CFTR en la membrana apical de las células epiteliales de pulmón, causando bajos

niveles de Cl⁻ y elevados niveles de absorción de agua y moco. Esto resulta en la acumulación de una gruesa capa de moco en las vías respiratorias de pacientes con fibrosis quística, creando un nicho que promueve el crecimiento de microorganismos. Por lo cual, el principal problema de pacientes con fibrosis quística es la pérdida progresiva de la función pulmonar, causada por una infección crónica originada y/o agudizada por *P. aeruginosa*. Aunque los antibióticos para el tratamiento contra *P. aeruginosa* pueden reducir la frecuencia y duración de las infecciones agudas, esta bacteria se establece permanentemente por lo que no se puede erradicar completamente de los pulmones. Todo lo anterior provoca la muerte prematura del 80% de los pacientes que presentan fibrosis quística (Goldber & Pier, 2000). Además de infectar las vías respiratorias de estos pacientes, *P. aeruginosa* es también la primer causa de infecciones nosocomiales, muerte y sepsis en individuos con sistemas inmunocomprometidos (aquellos con quemaduras, VIH o en tratamientos de quimioterapias) (Conway *et al.*, 2003). Así mismo, se ha determinado que cepas con deficiencia en la producción de piocianina provocan una menor respuesta inflamatoria además de un menor efecto en la virulencia, por lo que no pueden establecer una infección pulmonar crónica o aguda (Lau *et al.*, 2014).

Por otra parte, la piocianina puede inhibir el crecimiento de microorganismos competidores. Por ejemplo, existe una fuerte correlación entre la producción de este metabolito y una baja incidencia de infecciones fúngicas. Específicamente se ha visto que la piocianina suprime el crecimiento de la fase virulenta de *Candida albicans* (Cogen *et al.*, 2009). De esta forma, los efectos de las fenazinas en el hospedero pueden ser positivos y/o negativos simultáneamente.

Además, la piocianina funge como molécula señalizadora al activar directamente el factor transcripcional SoxR y de este modo controlar la expresión de diversos genes que participan en el transporte a través de la membrana y como respuesta al estrés oxidativo (Dietrich *et al.*, 2006). Bajo condiciones de crecimiento anaeróbico, dado principalmente en las capas internas de “*biofilm*”, se propone que la piocianina podría ser necesaria para reoxidar NADH con el fin de sostener la glicólisis y por lo

tanto tener una función respiratoria en *P. aeruginosa* (Price-Whelan *et al.*, 2007). Así mismo, análisis transcriptómicos han demostrado que esta fenazina altera la expresión de 51 genes durante la fase estacionaria de crecimiento (Dietrich *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011).

Se ha determinado que la actividad redox de la piocianina origina diversos impactos fisiológicos, bajo condiciones de crecimiento rico en nutrientes, la piocianina producida por *P. aeruginosa* ayuda a mantener la homeostasis de los estados redox, sobre todo en ausencia de aceptores de electrones alternativos, lo cual permite el mantenimiento de las células en condiciones anoxigénicas. De igual forma, se ha determinado que en condiciones de crecimiento carentes de carbono y otros nutrientes la piocianina se comporta como un agente tóxico para la mayor parte de la población celular (Meirelles *et al.*, 2018). Debido a la toxicidad que presenta la piocianina, se ha documentado que *P. aeruginosa* presenta alta actividad de superóxido dismutasa para protegerse de los efectos nocivos de este metabolito (Hesset *et al.*, 1992). De igual forma, se ha determinado que estos metabolitos ejercen un efecto importante en el fenotipo de las mismas bacterias productoras. Por ejemplo, Hernández *et al.*, (2004) sugieren que la excreción de fenazinas contribuye a la adquisición de hierro a través de la reducción de Fe^{3+} , contenido en minerales, en Fe^{2+} más soluble el cual es tomado por los sideróforos. Asimismo, se ha determinado que mutantes que no producen piocianina muestran cambios en el fenotipo de “*biofilm*” y un decremento en en la colonización de tejido pulmonar en modelos murinos (Recinos *et al.*, 2012).

1.2.2 Biosíntesis

La biosíntesis de piocianina es una ramificación de la vía Shikimato, responsable de la producción de compuestos aromáticos en bacterias y plantas. El ácido corísmico, uno de los compuestos intermediarios de esta vía, sirve como precursor de la estructura básica de las fenazinas (Calhoun *et al.* 1972; Longley *et al.* 1972). Las reacciones intermediarias para la síntesis de piocianina son iniciadas a partir de la conversión del ácido corísmico en 2-amino-2-desoxiisocorismato (ADOIC) por la

sintasa PhzE, responsable de la integración de los átomos de nitrógeno. A su vez, está ADOIC es hidrolizada por la enzima isocorismatasa PhzD originando el ácido trans-2,3-dihidro-3-hidroxiantranílico (DHHA) y piruvato. La participación de la isomerasa PhzF es crucial para la transformación de DHHA en ácido 6-amino-5-oxociclohex-2-ene-1-carboxílico (AOeC), el cual se une con otra molécula de ácido AOeC gracias al heterodímero PhzA y PhzB para formar un precursor tricíclico que sufre una descarboxilación oxidativa generando ácido 5,10-dihidrofenzazin-1-carboxílico, posteriormente esta forma reducida será transformada por PhzG para la formación de fenazin-1-carboxílico (PCA) (Menten *et al.*, 2009). Finalmente, la molécula de PCA sufre un rearrreglo por parte de la metil-transferasa PhzM resultando en 5-metil-PCA hidroxilado el cual es sustrato de PhzS para generar 5-metilfenazin-1-ona o piocianina (Parsons *et al.*, 2007; Greenhagen *et al.*, 2008) (Figura 2.).

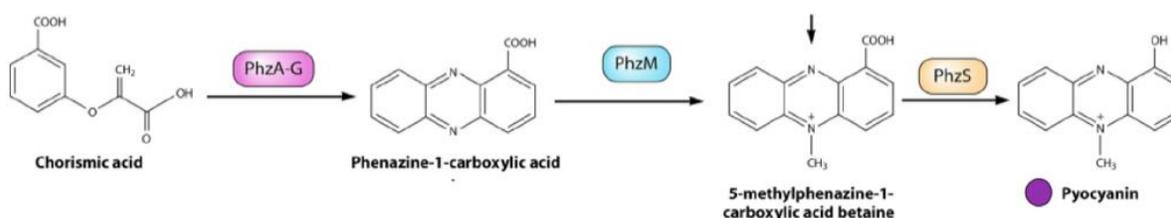


Figura 2. Biosíntesis de piocianina a partir de ácido corísmico (Modificada a partir de Mavrodi *et al.*, 2001).

1.2.3 Regulación de la síntesis de piocianina

En *P. aeruginosa* PAO1, los genes que codifican para las proteínas involucradas en la síntesis de PCA se encuentran agrupados en los dos operones reiterados, *phzA1B1C1D1E1F1G1* (*phzA1-G1*) y *phzA2B2C2D2E2F2G2* (*phzA2-G2*) los cuales presentan hasta un 98% de identidad entre ellos. Por otra parte, los genes *phzM* y *phzS* se encuentran flanqueando al operón *phzA1-G1* y son esenciales para la formación de piocianina (Figura 3) (Mavrodi *et al.*, 2001).

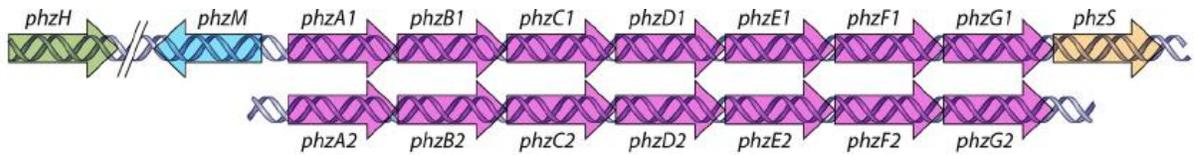


Figura 3. Genes estructurales de los operones reiterados *phzABCDEFG* así como los genes *phzH*, *phzM* y *phzS* los cuales participan en la síntesis de fenazinas, incluida la piocianina.

Debido al alto grado de identidad nucleotídica entre los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* el análisis individual de su expresión por técnicas de hibridación de ADN no es viable (Shuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003; Rampioni *et al.*, 2007, 2010). Al encontrarse localizados en diferentes regiones del cromosoma, ambos operones presentan regiones promotoras distintas (Mavrodi *et al.*, 2001; Whiteley & Greenberg, 2001; Rampioni *et al.*, 2007; Winsor *et al.*, 2011). El operón *phzA1-G1*, que va de PA4210 a PA4216, se encuentra flanqueado por *phzM* (PA4209) río arriba y por *phzS* (PA4217) río abajo, ambos son esenciales en la producción de piocianina. El operón *phzA2-G2* (de PA1899 a PA1905) se encuentra flanqueado por *qscR* (PA1898) río arriba, que codifica para el receptor huérfano QscR, y por PA1906 río abajo, el cual codifica para una proteína hipotética con función desconocida. Aunque se ha determinado que los genes que flanquean el operón *phzA1-G1*, es decir *phzM* y *phzS*, son esenciales en la producción de piocianina y que por lo tanto el operón *phzA1-G1* podría estar más relacionado en la síntesis de este compuesto, se ha determinado que el operón *phzA2-G2* aporta de forma significativa en la síntesis de piocianina, sobre todo en condiciones de crecimiento no planctónicas (Recinos *et al.*, 2012; Dietrich *et al.*, 2013).

La información disponible acerca de la regulación del operón *phzA1-G1* es mayor a la que se tiene del operón *phzA2-G2*. La caja *lux*, predicha en la región promotora -10 de *phzA1* (*PphzA1*), es una región en la que puede unirse tanto LasR como RhIR (Whiteley & Greenberg, 2001). Por medio de ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) se ha determinado que el represor del sistema QS RsaL, puede unirse río abajo de la región promotora -10 de esta caja *lux*, actuando como represor de la transcripción del operón *phzA1-G1* (Rampioni *et al.*, 2007). Además de regularlo de manera directa, en la cepa PA1201, RsaL activa la transcripción de

CdpR, un represor del operón *phzA1-G1*, ejerciendo un efecto negativo indirecto sobre *phzA1-G1* al incrementar la producción de la proteína CdpR (Sun *et al.*, 2017).

El conocimiento acerca de la regulación del promotor del gen estructural *phzA2* (*PphzA2*) es limitado. Sin embargo, la región intergénica entre gen *qscR* y el operón *phzA2-G2* ha sido probada para la unión de RsaL en diferentes grupos, con resultados negativos (Rampioni *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2017). No obstante, se ha determinado que RsaL posee un efecto opuesto en ambos operones, *phzA1-G1* y *phzA2-G2*, ya que la actividad de *PphzA1* incrementa en un 298% mientras que *PphzA2* muestra un decremento del 80% en mutantes *rsaL*. Asimismo, se ha determinado que la transcripción del operón *phzA2-G2* es inducida por HHQ bajo condiciones de crecimiento anaeróbicas (Recinos *et al.*, 2012). La identificación de los sitios de unión ANR/DNR en la región *PphzA2* sustenta la noción del aumento de la transcripción del operón *phzA2-G2* en condiciones de crecimiento anaeróbico (Trunk *et al.*, 2010). De igual forma, se ha determinado que la proteína QscR, un regulador huérfano del sistema QS y que se encuentra río arriba del gen estructural *phzA2*, posee un efecto represor sobre el operón *phzA2-G2* (Ledgham *et al.*, 2003; Lequette *et al.*, 2006). Sin embargo, esta regulación es de manera indirecta ya que QscR no se une a la región reguladora de *phzA2*, y se propone que podría hacerlo al formar heterodímeros inactivos con LasR y RhlR que impactarían en la expresión de dicho operón (Chugani *et al.*, 2001).

Además de la regulación por los sistemas de QS, se ha demostrado que la producción de piocianina varía dependiendo la temperatura. Por ejemplo, en la cepa PAO1, los niveles de producción de este compuesto son mayores cuando la bacteria crece a 37 °C, en comparación con la producción dada a 28°C (Huang *et al.*, 2009). Dicho patrón se observa también en la cepa PA14, un aislado clínico altamente virulento (Wurtzel *et al.*, 2012). Al considerar la naturaleza patógena de ambas cepas, se ha propuesto que el incremento en la producción de este factor de virulencia es una adaptación que favorece la supervivencia de *P. aeruginosa* en mamíferos, cuya temperatura corporal promedio es cercana a los 37 °C. Asimismo,

este fenómeno se ha observado en la expresión de genes de virulencia de otras bacterias patógenas de mamíferos (Konkel & Tilly., 2000). Sin embargo, el patrón de producción no es universal para todas las cepas de *P. aeruginosa*. Estudios con aislados ambientales han demostrado que el patrón de producción puede ser totalmente inverso. Inclusive, se ha observado que la piocianina no es la fenazina predominante. En la cepa M18, aislada de la rizosfera de melón, la relación PCA-piocianina es de 105:1 a 28 °C y de 5:1 a 37 °C. En contraste, en la cepa PAO1, la piocianina es predominante en relación 2:1. Además, los niveles absolutos de PCA en la cepa M18 son 9 veces más altos que en la cepa PAO1, mientras que los niveles de piocianina en la cepa PAO1 son 3.5 veces más altos que en la cepa M18 (Huang *et al.*, 2009). Se ha determinado que la producción de piocianina es regulada principalmente por el sistema Rhl, el cual regula de forma positiva los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2*. Se ha reportado que este sistema se puede sobreponer al sistema Las, es decir, el sistema Rhl se puede activar aun en ausencia de la actividad del sistema Las. Asimismo, el sistema Rhl posee una regulación negativa sobre el sistema Pqs, mientras que el sistema Pqs presenta una regulación positiva hacia el sistema Rhl lo que señala una regulación cruzada que mantiene un estado de homeostasis entre estos sistemas beneficiando así la síntesis de piocianina (Venturi *et al.*, 2006).

2 Antecedentes

La primera vez que se caracterizó los genes estructurales contenidos en el operón *phzABCDEFG* como aquellos que participan en la síntesis de fenazinas (Mavrodi *et al.*, 1998) y que *P. aeruginosa* presenta dos copias de este operón, se determinó que esta podría ser una de las razones por las que se da la alta producción de fenazinas (Mavrodi *et al.*, 1998). A pesar de tener una identidad del 98% en su secuencia nucleotídica y una actividad biosintética homóloga, los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* poseen una actividad transcripcional diferente y una aportación a la biosíntesis de piocianina variable, dependiente de la cepa y las condiciones de crecimiento. El estudio de los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* ante factores internos, como el lenguaje de comunicación QS, o externos, como la disponibilidad

de nutrientes, a conducido a identificar diversos mecanismos de regulación entre ambos operones.

En un estudio realizado por Cui *et al.*, (2016) se identificó la regulación cruzada entre los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2*. Evidenciado a través del aumento en la expresión de uno de ellos en ausencia del otro, los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* poseen un mecanismo de homeostasis que mantiene regulados los niveles de piocianina en la cepa PAO1 (Cui *et al.*, 2016). Por otra parte, Higgins *et al.*, (2018) realizaron ensayos en medio rico LB a 37 °C con la cepa clínica PAO1. Su objetivo fue evaluar la regulación diferencial de ambos operones. Los resultados de este estudio demostraron que la actividad de ambos operones requiere la presencia de elementos del sistema QS, tal como el factor transcripcional RhIR, un regulador positivo tanto del operón *phzA1-G1* como del operón *phzA2-G2*, así como de la presencia de la proteína PqsE, capaz de activar ambos operones en condiciones aerobias y anaerobias. Asimismo, se demostró que en condiciones de crecimiento planctónico la actividad transcripcional del operón *phzA1-G1* es mas alta que la actividad detectada en el operón *phzA2-G2*. Por otra parte, Recinos *et al.*, (2012) evaluaron diferentes mutantes de la cepa PA14 demostrando que las mutantes sencillas, $\Delta phzA1-G1$ y $\Delta phzA2-G2$, producen menos PCA comparado con la cepa silvestre PA14. A pesar de que la producción de PCA es mayor en cepa mutante $\Delta phzA1-G1$, el total de PCA sintetizado por ambas mutantes no alcanza los niveles de PCA dados por la cepa silvestre PA14. Debido a la modificación de PCA por otros intermediarios, que no permitian observar de forma precisa la producción de piocianina dada por los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2*, se realizó una triple mutante ($\Delta phzHMS$). La biosíntesis de PCA dada por la triple mutante $\Delta phzHMS$ fue mayor, en comparación con la cepa silvestre PA14, esto represento la producción total de PCA dada por los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2*. Bajo este contexto, la cepa mutante $\Delta phzA1-G1\Delta phzHMS$ mostró un ligero decremento en la síntesis de PCA mientras que la cepa mutante $\Delta phzA2-G2\Delta phzHM$ redujo drásticamente la producción de PCA, indicando que el operón *phzA2-G2* es responsable de la mayor parte de PCA producido en medio líquido. A pesar de que

la producción de piocianina ha tenido mejor caracterización en cultivos líquidos, las fenazinas han mostrado diversos efectos en el fenotipo de las colonias de *P. aeruginosa* originando fenotipos lisos y/o rugosos en “*biofilm*” (Dietrich *et al.*, 2008). Recinos *et al.*, (2012) compararon el desarrollo del fenotipo de las colonias formadoras de “*biofilm*” de las cepas que inactivan un solo operón $\Delta phzA1-G1$, $\Delta phzA2-G2$, la doble mutante $\Delta phzA1-G1\Delta phzA2-G2$ y la cepa silvestre PA14. A pesar de que la doble mutante $\Delta phzA1-G1\Delta phzA2-G2$ mostró un fenotipo rugoso, se determinó que la presencia del operón *phzA2-G2* es suficiente para mantener el fenotipo silvestre, mientras que la inactivación de este mismo operón da lugar a un fenotipo hiper-rugoso, aún más que el fenotipo rugoso mostrado por la doble mutante. Los “*biofilms*” formados por las cepas $\Delta phzA2-G2$ y $\Delta phzA1-G1\Delta phzA2-G2$, muestran un incremento en la superficie que cubren en comparación con la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que el operón *phzA2-G2*, y no el operón *phzA1-G1*, es importante para la producción de fenazinas en las colonias formadoras de “*biofilm*”. Los ensayos de estas mutantes, para evaluar la capacidad de infección en modelos murinos, permitieron determinar la importancia del operón *phzA2-G2* en la cepa PA14 cuya colonización se vio disminuida en ausencia de este operón (Recinos *et al.*, 2012).

Los operones redundantes *phzA1-G1* y *phzA2-G2* también han sido identificados en el genoma de cepas ambientales de *P. aeruginosa*. El grupo de Li *et al.*, (2011) construyó dos mutantes sencillas que inactivan los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* en la cepa M18, un aislado de la rizosfera de melón, con el fin de evaluar la actividad biosintética de fenazinas dada en esta cepa. Los resultados de Li *et al.*, mostraron que moléculas precursoras de piocianina como PCA, producidas por el operón *phzA2-G2*, son capaces de autorregular su propia expresión y al mismo tiempo activar la expresión de *phzA1-G1* mostrando un patrón de amplificación, algo similar a lo reportado por el grupo de Higgins *et al.*, (2018). Sin embargo, la expresión post-transcripcional de *phzA1-G1* es bloqueada a través de regiones específicas que se encuentran en su secuencia nucleotídica. En contraste, ellos reportan que la transcripción del operón *phzA2-G2* es poco eficiente pero su traducción es alta.

Asimismo, el operón *phzA2-G2* es regulado negativamente a nivel post-transcripcional de manera indirecta por GacA, un regulador global que forma parte del sistema de doble componente GacS/GacA. Por lo cual, Li *et al.*, (2011) concluyen que las moléculas de PCA producidas en diferentes cantidades, por *phzA1-G1* y *phzA2-G2*, actúan como un mediador funcional y los dos operones desarrollan un mecanismo de regulación específica que actúa a través de una región en particular para transferir una sola pero compleja señal en la cepa M18.

En el presente proyecto se trabajó con la cepa *P. aeruginosa* ID4365, un aislado ambiental proveniente del Mar de Goa, cuya característica principal es la sobreproducción de piocianina con respecto a otros aislados, tanto clínicos como ambientales. En comparación a la cepa PAO1, la cantidad de piocianina sintetizada por la cepa ID4365 llega a ser hasta 37 veces mayor, alcanzando su mayor producción cuando la cepa crece a 30 °C, esto contrasta con la cepa PAO1 que produce una mayor cantidad de piocianina a 37 °C. Este patrón de termorregulación es similar al reportado en la cepa M18 (Huang *et al.*, 2009; Grosso-Becerra *et al.*, 2014). De igual forma se ha caracterizado que la cepa ID4365 es incapaz de realizar “swimming” y “swarming” (Grosso-Becerra *et al.*, 2014). Similar a la cepa PAO1 y PA14, este aislado contiene en su genoma dos operones reiterados para la producción de piocianina. En un trabajo realizado previamente por Santos-Medellin (2012), se midió la actividad transcripcional de los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* en la cepa ID4365 evidenciando una sobreexpresión de estos operones en comparación con la cepa PAO1. Además, identificó que la actividad transcripcional es mayor a 37 °C que a 30 °C, lo que permitió explicar la sobreproducción de piocianina pero no el aumento que presenta la síntesis de piocianina a 30 °C. Sin embargo, el aporte de cada operón a la sobreproducción de piocianina no ha sido estudiado. Asimismo, el análisis de la secuencia de la cepa ID4365 demostró que este aislado pertenece al mismo clado de la cepa PA14, un aislado clínico altamente patógeno.

3 Hipótesis

Debido a que la cepa ID4365 pertenece al clado de la PA14, es posible que el operón *phzA2-G2* tenga un mayor aporte en la síntesis de piocianina en diferentes temperaturas y medios de cultivo.

4 Objetivos

4.1 General:

Determinar la aportación de los operones redundantes *phzA1-G1* y *phzA2-G2* en la síntesis de piocianina de la cepa sobreproductora ID4365 de *P. aeruginosa* crecidas a 30 °C y 37 °C en medio LB y PPGAS.

4.2 Particulares:

- Obtener mutantes sencillas en los operones *phzA1-G1*, *phzA2-G2* y una doble mutante en ambos operones.
- Determinar la producción de piocianina en las cepas mutantes en medio PPGAS y LB a 30 °C y 37 °C en comparación con la cepa silvestre.

5 Material y métodos

5.1 Material biológico y medios de cultivo.

Las cepas bacterianas usadas en este estudio se detallan en la tabla 1. Todas fueron crecidas rutinariamente en medio *Lysogeny Broth* (LB) o *Protease Peptone-Glucose-Ammonium Salts* (PPGAS) a 30 o 37 °C con agitación orbital a 225 rpm en el caso de medios líquidos e incubada a 37 °C durante 24 horas. Cuando fue requerido, el medio LB fue suplementado con los siguientes antibióticos: para *E. coli* tetraciclina (Tc) 15 µg ml⁻¹, estreptomycin (Sm) 30 µg ml⁻¹, ampicilina (Ap) 200 µg ml⁻¹; para *P. aeruginosa* Tc 120 µg ml⁻¹, Sm 1000 µg ml⁻¹ y carbenicilina (Cb) 200 µg ml⁻¹.

Cepa	Características	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ID4365	Tipo silvestre: aislado ambiental del Mar de Goa	(Manwar <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. aeruginosa</i> IDΔphz1::Tc	Mutante con operón <i>phzA1-G1</i> inactivado	Este trabajo
<i>P. aeruginosa</i> IDΔphz2::Sm	Mutante con operón <i>phzA2-G2</i> inactivado	Este trabajo
<i>P. aeruginosa</i> IDΔphzs	Mutante con operones <i>phzA1-G1</i> y <i>phzA2-G2</i> inactivados	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i> DH5α	φ80Δ <i>lacZ</i> ΔM15Δ[<i>lacZYA-argF</i>] U169 <i>endA recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44</i> ; Cepa no patógena.	(Hanahan, 1983); Invitrogen

Tabla 1. Cepas utilizadas

5.2 Manipulación de ADN

Todos los plásmidos generados y/o utilizados en este estudio se enlistan en la tabla 2. La manipulación rutinaria de ADN incluyendo extracción, restricción, ligación, electroporación y electroforesis con gel de agarosa fueron realizados siguiendo los métodos moleculares estándares en el laboratorio (Sambrook *et al.*, 1987; Fillux & Ramos, 2014). La extracción de los plásmidos se realizó con el kit Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System siguiendo las instrucciones del proveedor. Las reacciones en polimerasa de cadena (PCR) se realizaron con las enzimas ADN polimerasa GoTaq® Flexi DNA (PROMEGA) y ADN polimerasa de alta fidelidad *Phusion Hot Start II* (Thermo Scientific), se utilizaron enzimas de restricción New England BioLabs y para las ligaciones se utilizó la T4 DNA ligase (Promega). Todos los plásmidos se trabajaron en la cepa *E. coli* DH5α y se transformaron en *P.*

aeruginosa ID4365 por electroporación (Cadoret, Soscia y Voulhoux, 2014; Fillux & Ramos, 2014). Todos los oligonucleótidos usados para la amplificación de ADN por PCR se encuentran detallados en la tabla 3. La síntesis de oligonucleótidos y la secuenciación de ADN usado en las construcciones de los plásmidos fueron realizados en la Unidad de Síntesis y secuenciación de ADN (USSDNA) en el Instituto de Biotecnología, UNAM.

Plásmido	Características	Referencia
pEX18-Gm	Vector para reemplazo de genes por recombinación en <i>P. aeruginosa</i> con resistencia a Gm	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pEXTcZ1R	Derivado del pEX18-Gm que porta un fragmento de 2,602 pb incluyendo una región parcial 5`- <i>phzA1</i> y 3`- <i>phzG1</i> flanqueando un casete de resistencia a Tc	Este trabajo
pEXSmZ2R	Derivado del pEX18-Gm que porta un fragmento de 2,400 pb incluyendo una región parcial 5`- <i>phzA2</i> y 3`- <i>phzG2</i> flanqueando un casete de resistencia a Sm	Este trabajo
Mini-CTX-lux	Plásmido que porta el casete de resistencia a tetraciclina Tc	(Becher & Schweizer, 2000)

pJET1.2/blunt	Vector de clonación con resistencia a Amp	Thermo Scientific
pJET / <i>phzA1-G1</i>	Vector de clonación con el fragmento <i>phzA1-G1</i> clonado	Este trabajo
pJET / <i>phzA2-G2</i>	Vector de clonación con el fragmento <i>phzA2-G2</i> clonado	Este trabajo
pIJ778	Plásmido que porta el casete de resistencia a Sm	(Gust <i>et al.</i> , 2003)

Tabla 2. Lista de plásmidos

Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de restricción
RwphzA1 Hindiii	TTAGCGAAGCTTCCTGTTCCAGAGCCTTTTCC	HindIII
phzA1 Fw Tc5	GAGGACCGAAGGAGCTAACCGTTCATGCGCCG CCTCCGAG	
UpPhzG1Tc	GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCCTGGAGTCGGT GGAGTTCTG	
DwnPhzG1Tc	TTAGCGAAGCTTGTATCTCGCTGCTGCTTTCC	HindIII

FwphzA2 Hindiii	GAACGTAAGCTTCATCGGCCTGCTCAACTGAA	HindIII
phzA2 FwStm	GTCGACGGATCCCCGGAATATCGCATGGTGCG AATCTCCG	
UpPhzG2Sm	GAAGCAGCTCCAGCCTACACTGGAGTCGGTGG AGTTCTG	
DwnPhzG2Sm	CTATATAAGCTTGTGCATTTCCACCTGATTCC	HindIII
fwTcR (2923)	GGTTAGCTCCTTCGGTCCTC	
RvTcR (2424)	GCTTCCTCGCTCACTGACTC	
ApraFw (9522)	TATTCCGGGGATCCGTCGAC	
ApraRv (9523)	TGTAGGCTGGAGCTGCTTC	
DwH3-phzA1-pET	CCCAAGCTTAGTGGGAATACCGTCACGTT	HindIII
M13Fw (10702-2015)	TGTAAAACGACGGCCAGT	
plac-hind-rev (1783-2017)	CTT TGA GTA AGC TTA TAC CGC	HindIII

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos

5.3 Generación de las mutantes en los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2*

Brevemente, para la mutación del operón *phzA1-G1* se amplificaron por PCR 506 pares de bases (pb) río arriba de *phzA1* y que incluye una parte de *phzM* (5´) y 463 pb río abajo de *phzG1* que incluye parte de *phzS* (3´). Por otro lado, usando como templado ADN del plásmido mini-CTX-lux se amplificó 1633 pb correspondientes al casete de resistencia Tc. Los tres productos se purificaron usando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System y se usaron como templado para correr una PCR de tres piezas cuyo amplificado resultante 5´Tc3´ fue purificado, digerido con la enzima HindIII y finalmente ligado al vector suicida pEX18Gm, previamente cortado con HindIII y defosforilado para su posterior ligación generando el plásmido pEXTcZ1R. Para el caso de la doble recombinación homóloga en el operón *phzA2-G2* con el plásmido pEXSmZ2R se llevó a cabo un proceso similar, amplificando 506 pb río arriba de *phzA2* y un fragmento de *qscR* (5´), 481pb río abajo de *phzG1* y un fragmento de PA1906 (3´) así como la amplificación de 1413 pb correspondientes al casete de resistencia Sm, obtenido a partir del plásmido pIJ778. Los tres fragmentos fueron unidos mediante PCR de tres piezas para obtener el fragmento 5´Sm3´, purificado y digerido con la enzima HindIII y defosforilado para su ligación al vector suicida pEX18Gm que también se cortó con HindIII para obtener finalmente el plásmido pEXSmZ2R. Todas las purificaciones se realizaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Las construcciones pEXTcZ1R y pEXSmZ2R fueron mezcladas por separado en tubos con células *E. coli* quimiocompetentes (100 µL), las cuales se incubaron 30 minutos en hielo, posteriormente se dio un choque de calor a 42 °C por dos minutos y se agregó 1 mL de medio LB líquido para dejarlo incubar 1 hora a 37 °C, finalmente se plateó en medios LB sólidos suplementados con Tc 15 µg ml⁻¹ y Sm 30 µg ml⁻¹ respectivamente. Finalmente se seleccionaron candidatas, las cuales fueron verificadas por PCR, patrón de restricción y secuenciación.

Para la producción de las mutantes en los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* se utilizó el método reportado por Choi & Schweizer (2005) que se basa en la sustitución del

gen blanco por doble recombinación homóloga. La transformación de *P. aeruginosa* ID4365 se realizó siguiendo los protocolos reportados por Fillux & Ramos (2014), en síntesis: a partir de un pre-cultivo de 16 horas de la cepa ID4365 se tomó lo necesario para ajustar a una densidad óptica (D.O.) inicial de 0.05 en medio LB fresco y se incubó a 37 °C hasta alcanzar una D.O. final entre 0.5 y 0.6, se tomó 1 mL y se centrifugó 1 minuto a 14,000 rpm para obtener el paquete celular, el cual se lavó dos veces con sacarosa al 10% y se resuspendió en 1 mL de sacarosa con 2000 ng de ADN plasmídico y se incubó en hielo durante 30 minutos previo a la electroporación, posteriormente la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación-BIO-RAD® y se dio un choque eléctrico de 1.8 volts usando el equipo BIO-RAD® *Gene Pulser Electroporation system*. Una vez dado el choque eléctrico la mezcla se transfirió a un tubo con 2 mL de medio *Super Optimal Broth* (SOC) y se incubó 3 horas a 37 °C con agitación orbital de 250 rpm, finalmente se tomó 175 µL de cultivo y se sembró en placas de LB agar adicionadas con Tc120 µg ml⁻¹ para IDΔphz1::Tc, Sm1000 µg ml⁻¹ para IDΔphz2::Sm y Tc 120 µg ml⁻¹ Sm1000 µg ml⁻¹ para IDΔphzs con el objetivo de seleccionar colonias resistentes a los antibióticos de selección.

Las mutaciones fueron confirmadas por PCR utilizando los oligonucleótidos RwphzA1 HindIII y DwnPhzG1Tc que amplifican las regiones de los extremos 5´Tc3´ del plásmido pEXTcZ1R en el caso de la mutante IDΔphz1::Tc y FwphzA2 HindIII y DwnPhzG2Sm que amplifican las regiones de los extremos 5´Sm3´ del plásmido pEXSmZ2R en el caso de la mutante IDΔphz2::Sm. En el caso de la doble mutante, IDΔphzs, se confirmó utilizando los oligonucleótidos anteriormente mencionados para amplificar tanto 5´Tc3´ como 5´Sm3´. Utilizando los oligonucleótidos RwphzA1 HindIII y DwH3phzA1pET así como FwphzA2HindIII y DwH3phzA1pET se verificó la ausencia de los genes estructurales *phzA1* y *phzA2* en las mutantes sencillas y la doble. Las reacciones de PCR para confirmar la presencia de los alelos mutantes contenidos en los plásmidos pEXTcZ1R y pEXSmZ2R así como la ausencia de los genes estructurales *phzA1* y *phzA2* se realizaron con la enzima Go Taq DNA Polymerase (Promega). Por otro lado, las reacciones para amplificar tanto el operón

phzA1-G1 como *phzA2-G2* se realizaron con los oligonucleótidos RwpHzA1 HindIII y DwnPhzG1Tc así como FwpHzA2 HindIII y DwnPhzG2Sm respectivamente, las amplificaciones de los operones completos se realizaron con la enzima Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific).

5.4 Protocolo de cuantificación de piocianina

La piocianina se cuantificó como se ha reportado (Essar *et al.*, 1990). Para ello se realizó un pre-cultivo de 16 horas en medio LB a 37 °C con agitación orbital a 250 rpm, suplementado con antibiótico si es el caso, de las cepas ID4365, ID Δ phz1::Tc, ID Δ phz2::Sm e ID Δ phzs. Posteriormente, a partir de este precultivo se inocularon matraces con 30 mL de medio LB o PPGAS a una D.O. inicial de 0.05 sin antibiótico, se dejaron crecer por 24 horas a 37 °C. Después de 24 horas, los cultivos se centrifugaron (14,000rpm por 10 minutos) y se guardaron los sobrenadantes. Se tomaron 3 mL de cada sobrenadante por triplicado y se les adiciono un volumen de cloroformo. Se separó la fase orgánica y se acidifico con un volumen de HCl 0.2 M para obtener una solución rosa a partir de la que se obtiene la concentración de piocianina al medirla a una densidad óptica de 520 nm y multiplicarlo por el coeficiente de absorción molar de 17,072 mol⁻¹cm⁻¹.

5.5 Análisis bioinformáticos

Las secuencias de los operones de *P. aeruginosa* ID4365 analizadas se obtuvieron de <http://pseudomonas.com/> . Los alineamientos de las secuenciaciones para verificar que no existieran mutaciones se realizaron en la página <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> y los oligonucleotidos fueron diseñados a través del programa Primer 3 input, <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>.

6 Resultados

6.1 Construcción de los plásmidos pEXTcZ1R y pEXSmZ2R

Con la finalidad de generar las mutaciones en cada uno de los operones así como una doble mutante en el fondo genético de *P. aeruginosa* ID4365, se construyó, a partir del plásmido suicida pEX18-Gm, dos plásmidos que portan la mutación para inactivar los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* (Hoang *et al.*, 1998). Siguiendo el protocolo reportado por Choi & Schweizer (2005), se obtuvo por medio de PCR las secuencias intergénicas, río arriba (5') y río abajo (3'), que flanquean tanto el operón *phzA1-G1* como del operón *phzA2-G2*. Además, se amplificaron los casetes de resistencia a los antibióticos Tc y Sm (Figura 4.).

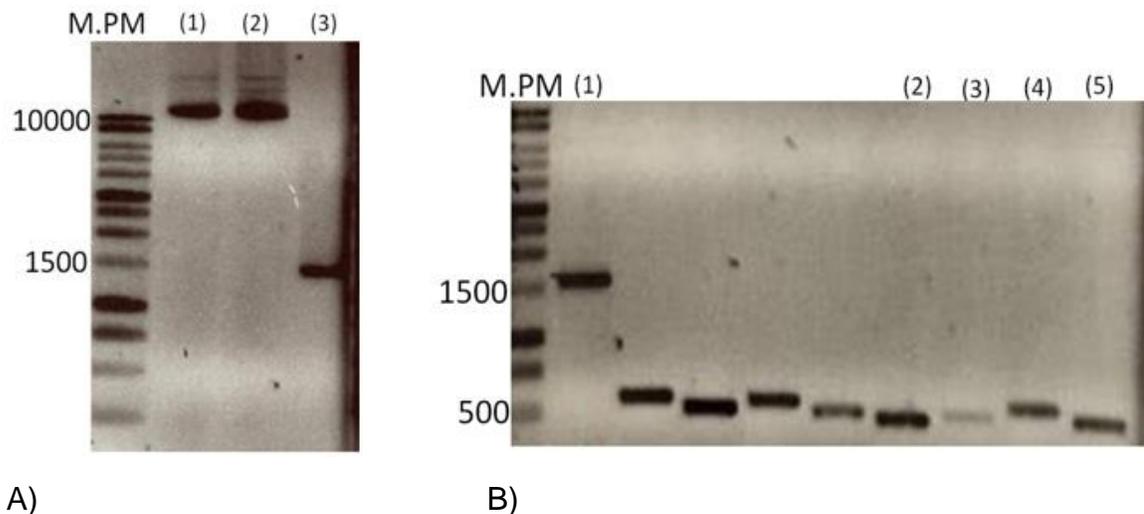


Figura 4. Amplificación de los fragmentos 5' y 3' a partir de los operones *phz* y los casetes de resistencia Tc y Sm. A) Carriles (1) y (2) muestran la presencia del plásmido pEX18Gm sin digerir, (3) muestra la amplificación de 1.4 kb correspondiente al casete de resistencia a Sm. B) Carril (1) amplificación esperada de 1.6 kb correspondiente al casete de resistencia a Tc, (2) amplificación de la región 5' del operón *phzA1-G1* (506 pb; *phzM-phzA1*), (3) amplificación de la región 3' del operón *phzA1-G1* (463 pb; *phzG1-phzS*); (4) amplificación de la región 5' del operón *phzA2-G2* (506 pb; *qscR-phzA2*), (5) amplificación de la región 3' del operón *phzA2-G2* (463-545 pb; *phzG2-PA1906*). Todos los productos fueron obtenidos a partir de ADN purificado de la cepa ID4365.

Los fragmentos purificados 5' y 3' de ambos operones, así como los casetes de resistencia a Tc y Sm, sirvieron como templado para la técnica PCR de tres piezas. A partir de esta PCR se obtuvo, para el caso de las regiones 5' y 3' del operón *phzA1-G1*, un fragmento 5'Tc3' de 2.6kb, que se utilizó para inactivar dicho operón; mientras que para el caso de la inactivación del operón *phzA2-G2*, se originó un fragmento 5'Sm3' de 2.4 kb (Figura 5.).

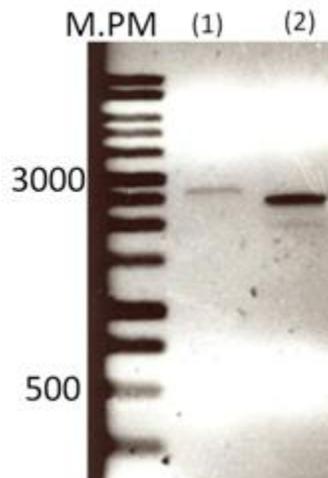
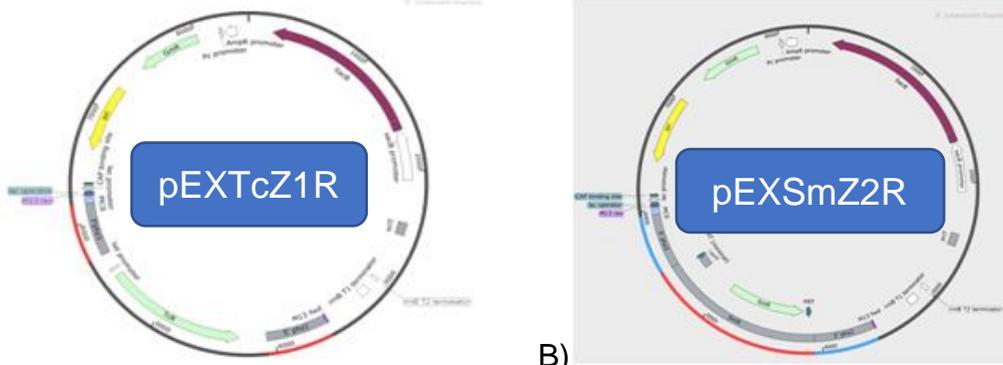


Figura 5. Purificación de los fragmentos obtenidos a partir de PCR de 3 piezas. El carril (1) muestra la banda con el fragmento 5'Tc3' de 2684 pb, constituido por los fragmentos 5' (506 pb) y 3' (563 pb) que flanquean el operón *phzA1-G1* unidos al casete de resistencia a Tc (1633 pb); En el carril (2) se muestra el fragmento 5'Sm3' de 2400 pb, constituido por los fragmentos 5' (506 pb) y 3' (545 pb) que flanquean el operón *phzA2-G2* unidos al casete de resistencia Sm (1413 pb).

Posteriormente, los fragmentos 5'Tc3' y 5'Sm3' fueron digeridos con la enzima de restricción HindIII, al igual que el plásmido suicida pEX18-Gm. Finalmente, se hizo la ligación de los fragmentos 5'Tc3' y 5'Sm3 al vector pEX18-Gm para ser movilizadas a las células competentes *E. coli* DH5 α , de las cuales, se obtuvieron dos candidatas, una resistente a Tc nombrándola pEXTcZ1R y una resistente a Sm llamándola pEXSmZ2R (Figura 6.).



A)

B)

Figura 6. Construcción de plásmidos *insilico*. La figura A) muestra el plásmido pEXTcZ1R el cual porta la mutación 5'Tc3', que permite inactivar el operón *phzA1-G1*. La figura B) muestra el plásmido pEXSmZ2R el cual porta la mutación 5'Sm3', que permite inactivar el operón *phzA2-G2*.

6.2 Verificación de los plásmidos pEXTcZ1R y pEXSmZ2R

Con la finalidad de verificar la construcción correcta de los plásmidos, se crecieron las candidatas en placas con medio LB suplementadas con los antibióticos Tc y Sm. Así, se verificó el marcador de selección por la resistencia a Tc en el caso de la cepa *E. coli* DH5 α que porta el plásmido pEXTcZ1R y la resistencia a Sm en el caso de la cepa *E. coli* DH5 α que porta el plásmido pEXSmZ2R. Adicionalmente, se extrajeron los plásmidos pEXTcZ1R y pEXSmZ2R y se amplificaron los fragmentos 5'Tc3' y 5'Sm3', respectivamente, a través de PCR (Figura 7.).

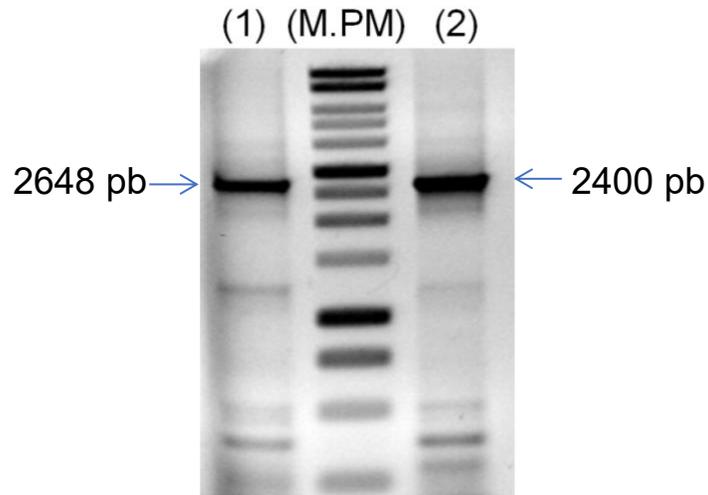


Figura 7. PCR usando como templado DNA de los plásmidos pEXTcZ1R y pEXSmZ2R. El carril central corresponde al marcador de peso molecular, los carriles (1) y (2) muestran los fragmentos 3'Tc5' de 2648 pb y 3'Sm5' de 2400 pb, respectivamente.

Posteriormente, los plásmidos anteriormente extraídos fueron verificados por patrón de restricción con la enzima de restricción HindIII que libera el fragmento clonado del vector pEX18-Gm (Figura 8).

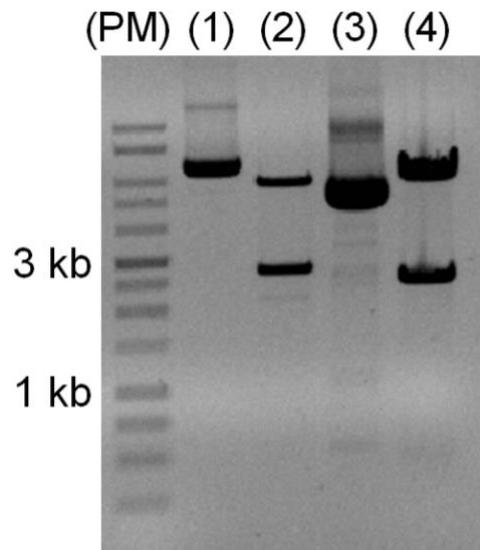


Figura 8. Verificación de las construcciones pEXTcZ1R y pEXSmZ2R por patrón de restricción usando la enzima HindIII. El carril (1) muestra el plásmido pEXTcZ1R sin digerir como control de la restricción, el carril (2) muestra el fragmento liberado 5'Tc3' (2684 pb) del plásmido pEXTcZ1R; El carril (3) muestra el plásmido pEXSmZ2R sin digerir como control positivo de la restricción, el carril (4) muestra el fragmento liberado 5'Sm3' (2400 pb) obtenido a partir del plásmido pEXSmZ2R.

Finalmente, ambos plásmidos fueron secuenciados. La secuencia de nucleótidos obtenida fue utilizada para realizar una alineación *in silico* contra la secuencia reportada en las mismas regiones, 5´ y 3´, en pseudomonas.com para la misma cepa ID4365 con la finalidad de verificar que las construcciones no portaran mutaciones. Los resultados mostraron que las secuencias no contenían cambios. Adicionalmente, se realizó un alineamiento con la cepa de referencia PAO1, lo anterior con el objetivo de identificar diferencias en las regiones que flanquean a los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2*. Cabe destacar que en todos los casos las regiones que flanquean a los operones fueron idénticas, a excepción de la región intergénica entre los genes estructurales *phzG1-phzS*, la cual posee 82 pb más en la cepa ID4365 en comparación con la cepa de referencia PAO1 (Figura 9.).

```

Query 1                                     CCGC 4
                                     ||||
Sbjct 661 CGCTACGACCGCGACGAAGGAGGCTGGAAGCACCGCTACCTGCAACCGTGACGACACCGC 720

Query 5  TGC GCCGGCGTTTCA----- 19
          |||
Sbjct 721 TGC GCCGGCGTTT CACGGCGGATATGCGTCCCGCGGCCCGGAGTCGGGCCGTAGGGCGA 780

Query 20 -----TGGCGGATAACCGCAAGCG 38
          |||
Sbjct 781 ATAACGCCACCGGCGTTATCCGCCGCTGCGCCGACGTTTTCATGGCGGATAACCGCAAGCG 840

Query 39  GTTATTGCCCCTACGCGGCCTTGGAGCCCATC-----TAACCGCACGCGGT 84
          |||
Sbjct 841 GTTATTGCCCCTACGCGGCCTCGAAGCTCACCCGTTTTACGGTGGATAACCGAATGCGGT 900

Query 85  CATGCGTACCGCGGCCTCGGAGCCGGTTCGTAGGGCGAATGACGCCACCGGCGTTATCCG 144
          |||
Sbjct 901 CATGCGTACCGCGGCCTCGGAGTCGGGCCGTAGGGCGAATAACGCCACCGGCGTTATCCG 960

Query 145 CCGCTGCGCCGACGTTTTCATCGCGGTAACCGGTCATCCATCCCAGCCGAACCCCATCGA 204
          |||
Sbjct 961 CCGCTGCGCCGACGTTTTCATCGCGGTAACCGGTCATCCGTCAGCCGAACCCCATCGA 1020

Query 205 TTCGAACACTCGAGAAAAGGAAGCACCCATGAGCGAACCATCGATATCCTCATCGCCGG 264
          |||
Sbjct 1021 TTCGAACACTCGAGAAAAGGAAGCACCCATGAGCGAACCATCGATATCCTCATCGCCGG 1080

Query 265 CGCCGGCATCGGCGGCCTCAGTTGCGCCCTGGCCCTGCACCAGGCCGGCATCGGCAAGG 323
          |||
Sbjct 1081 CGCCGGCATCGGCGGCCTCAGTTGCGCCCTGGCCCTGCACCAGGCCGGCATCGGCAAGGC 1140

```

Figura 9. Alineamiento *in silico* de la región 3' del operón *phzA1-G1*. Al verificar las regiones que flanquean cada operón por medio de alineamientos *in silico*, se encontró que la única región diferente entre la secuencia nucleotídica de la PAO1 e ID4365 fue la región río abajo del gen estructural *phzG1* la cual presenta una región de 82 pb más en comparación con la cepa de referencia PAO1

6.3 Generación de las mutantes sencillas ID Δ phz1::Tc, ID Δ phz2::Sm y la doble mutante ID Δ phzs en *P. aeruginosa* ID4365.

Los plásmidos anteriormente obtenidos se usaron para transformar la cepa ID4365 generando mutaciones por doble recombinación homóloga (Choi *et al.*, 2006). Así, los plásmidos pEXTcZ1R y pEXSmZ2R que portan la mutación para inactivar los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2*, con marcadores de selección a Tc y Sm respectivamente (Figura 10), fueron movilizados por electroporación generando así las cepas; ID Δ phz1::Tc que inactiva el operón *phzA1-G1* a través de la inserción de la región 5'Tc3' del plásmido pEXTcZ1R y la cepa ID Δ phz2::Sm que inactiva el operón *phzA2-G2* a través de la inserción de la región 5'Sm3' del plásmido pEXSmZ2R (Figura 10.).

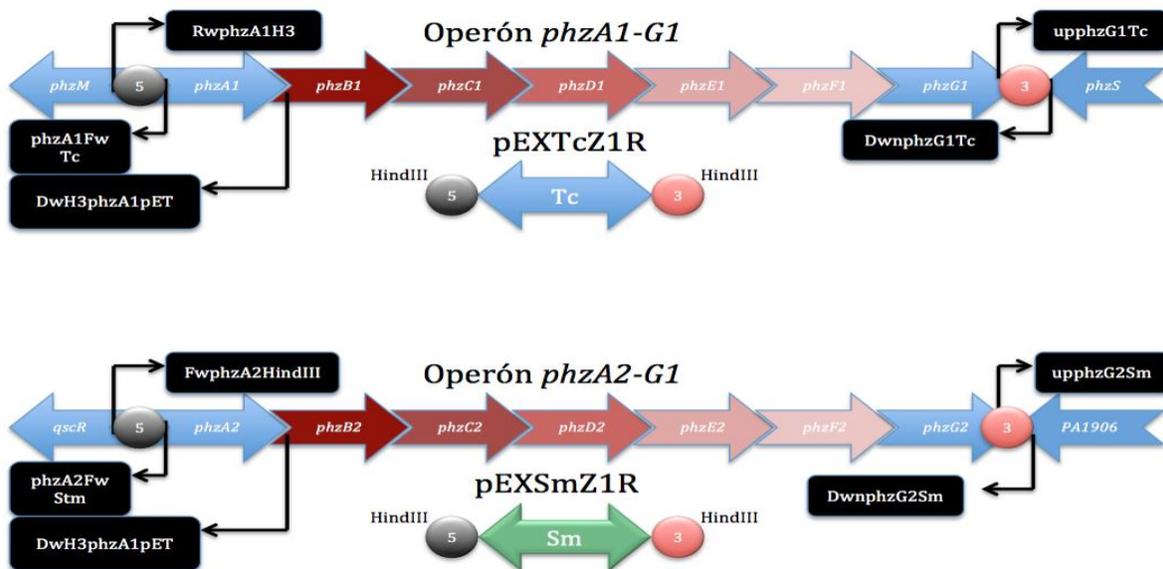


Figura 10. Esquema de la sustitución de los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* por las mutaciones contenidas en los plásmidos pEXTcZ1R y pEXSmZ2R respectivamente. La imagen superior muestra la forma silvestre del operón *phzA1-G1* y las regiones 5' 3' que lo flanquean. Así mismo, se muestra

la mutación 5'Tc3' que porta el plásmido pEXTcZ1R. Las regiones 5' y 3' de esta mutación son aquellas que inactivan el operón *phzA1-G1* por doble recombinación homóloga en el cromosoma de la cepa ID4365. De igual forma, la imagen inferior muestra la forma silvestre del operón *phzA2-G2* y las regiones 5' 3' que lo flanquean. Adicionalmente, se muestra la mutación 5'Sm3' que porta el plásmido pEXSmZ2R. Las regiones 5' y 3' contenidas en los plásmidos permiten una doble recombinación homóloga en el cromosoma de la cepa ID4365.

Posteriormente se verificó la ausencia del gen estructural *phzA1*, esto con el objetivo de comprobar que el operón *phzA1-G1* fue sustituido por la mutación antes mencionada. De forma complementaria, se realizó la amplificación del operón *phzA1-G1* en el cual se amplifica un fragmento de 7,267 pb en la cepa silvestre ID4365, mientras que en la cepa mutante IDΔ*phz1*::Tc se amplificó un fragmento de 2,648 pb, correspondientes al fragmento 5'Tc3', es decir, la mutación que sustituyó dicho operón. Las amplificaciones realizadas por PCR y verificadas en gel de agarosa se encuentran ilustradas en la figura 11.

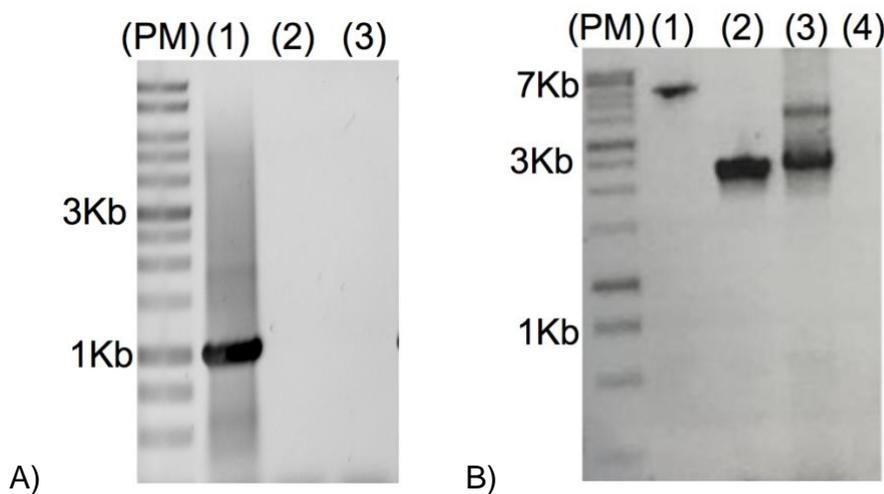


Figura 11. Verificación IDΔ*phz1*::Tc por medio de PCR. A) Carril (1) muestra la amplificación del gen estructural *phzA1* de 1000 pb obtenida a partir de ADN genómico de la cepa silvestre *P. aeruginosa* ID4365 usado como control positivo, Carril (2) muestra la ausencia del gen *phzA1* en la mutante IDΔ*phz1*::Tc, carril (3) control negativo sin ADN. B) Carril (1) amplificación del operón *phzA1-G1* de 7,267 pb obtenida a partir de ADN genómico de la cepa silvestre *P. aeruginosa* ID4365 usado como primer control positivo, (2) amplificación esperada de 2,684 pb correspondiente al fragmento 5'Tc3' de la construcción pEXTcZ1R usada como segundo control positivo obtenida a partir de ADN

plasmídico, (3) amplificación del fragmento 5'Tc3' y no del operón *phzA1-G1* en la mutante IDΔ*phz1*::Tc.

Respecto a la mutación en el operón *phzA2-G2*, se verificó la ausencia del gen estructural *phzA2* de la candidata por medio de PCR, esto con el objetivo de identificar que en la cepa mutante IDΔ*phz2*::Sm el operón *phzA2-G2* fue sustituido exitosamente por la mutación 5'Sm3' contenida en el plásmido pEXSmZ2R. De forma complementaria, se realizó la amplificación del operón *phzA2-G2*, que en la cepa silvestre amplificó un fragmento de 7,273 pb correspondientes al operón *phzA2-G2* mientras que en la cepa mutante IDΔ*phz2*::Sm se amplificó un fragmento de 2,400 pb, correspondientes al fragmento 5'Sm3' (Figura 12).

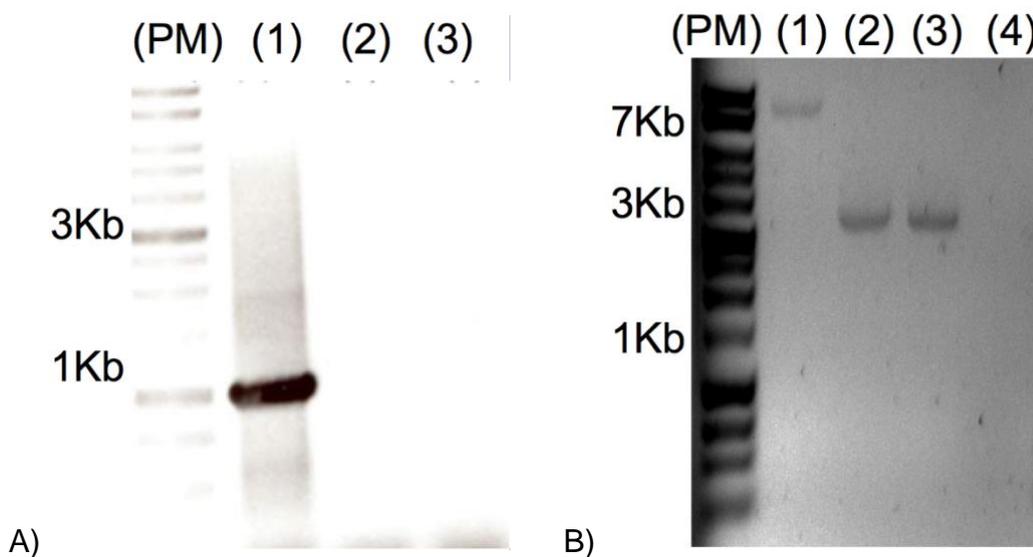


Figura 12. Verificación IDΔ*phz2*::Sm por medio de PCR. A) Carril (1) amplificación del gen estructural *phzA2* de 1000 pb obtenida a partir de ADN genómico de la cepa silvestre *P. aeruginosa* ID4365 usado como control positivo, (2) ausencia del gen *phzA2* en la mutante IDΔ*phz2*::Sm, (3) control negativo sin ADN. B) Carril (1) amplificación del operón *phzA2-G2* de 7,273 pb obtenida a partir de ADN genómico de la cepa silvestre *P. aeruginosa* ID4365 usado como primer control positivo, (2) amplificación de 2400 pb correspondiente al fragmento 5'Sm3' de la construcción pEXSmZ2R usada como segundo control positivo obtenida a partir de ADN plasmídico, (3) amplificación del fragmento 5'Sm3' y no del operón *phzA2-G2* en la mutante IDΔ*phz2*::Sm.

Con el objetivo de corroborar que la inactivación de los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* abate la síntesis de piciocianina, y al mismo tiempo tener un control

negativo, se genero la doble mutante, que presenta la inactivación de ambos operones. La doble mutante, ID Δ phzs, se obtuvo al transformar la mutante ID Δ phz2::Sm con el plásmido pEXTcZ1R, de la cual se seleccionaron candidatas resistentes a Tc 120 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y Sm 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para finalmente ser confirmadas por PCR al verificar la ausencia de los genes estructurales *phzA1* y *phzA2* en la doble mutante ID Δ phzs. Asimismo, se verificó que la doble mutante ID Δ phzs presentara los casetes de resistencia que sustituyeron a los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* (Figura 13.).

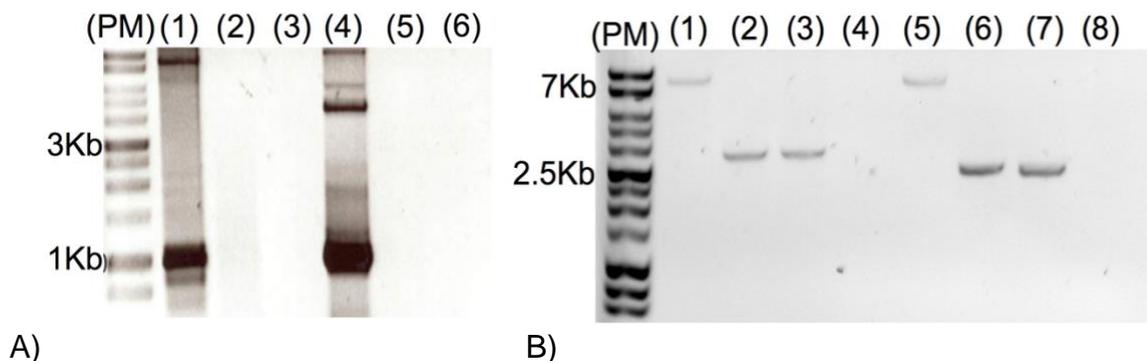


Figura 13. Verificación de la doble mutante ID Δ phzs por medio de técnica PCR. A) Los carriles (1) y (4) muestran la amplificación de los genes estructurales *phzA1* y *phzA2*, ambos de 1000 pb, obtenidos a partir de ADN genómico de la cepa silvestre *P. aeruginosa* ID4365, carriles (2) y (5) muestran la ausencia de *phzA1* y *phzA2* en la doble mutante ID Δ phzs, carriles (3) y (6) controles negativos sin ADN. B) Los carriles (1) y (5) muestran la amplificación de los operones *phzA1-G1* de 7,267 pb y *phzA2-G2* de 7,273 pb obtenidos a partir de ADN genómico de la cepa silvestre *P. aeruginosa* ID4365, carriles (2) y (6) muestran la amplificación esperada de 2,684 pb correspondiente al fragmento 5'Tc3' de la construcción pEXTcZ1R y 2,400 pb correspondiente al fragmento 5'Sm3' obtenidos a partir de ADN plasmídico, carriles (3) y (7) muestran la amplificación de los fragmentos 5'Tc3' y 5'Sm3' en la doble mutante ID Δ phzs.

6.4 Evaluación de la producción de pocianina en LB y PPGAS a 30

°C

Se ha determinado que la síntesis de fenazinas dada por los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2*, en cultivos líquidos de *P. aeruginosa*, inicia durante la fase de

crecimiento estacionario a partir de su etapa temprana. Por lo anterior, la evaluación del aporte de piocianina dada por cada operón se realizó a las 24 horas cuando el crecimiento bacteriano se encuentra en la fase estacionaria tardía. Asimismo, para todas las evaluaciones realizadas en este estudio se consideró la cepa silvestre ID4365 como control positivo y la doble mutante ID Δ phzs como control negativo.

Los ensayos de crecimiento en medio rico LB y medio bajo en fosfatos PPGAS durante 24 horas a 30 °C permitieron determinar la actividad biosintética de piocianina dada por *phzA1-G1* y *phzA2-G2* bajo estas condiciones. Como se muestra en la figura 14, visualmente se aprecia que la producción de la piocianina es baja en medio LB. Sin embargo, la mutante ID Δ phz1::Tc presenta una coloración verde lo que indica presencia de esta fenazina en el medio. Lo anterior sugiere que el operón *phzA2-G2* se expresa en estas condiciones, permitiendo una mayor producción de piocianina en la cepa ID Δ phz1::Tc en comparación con la cepa silvestre ID4365 (figura 14.).

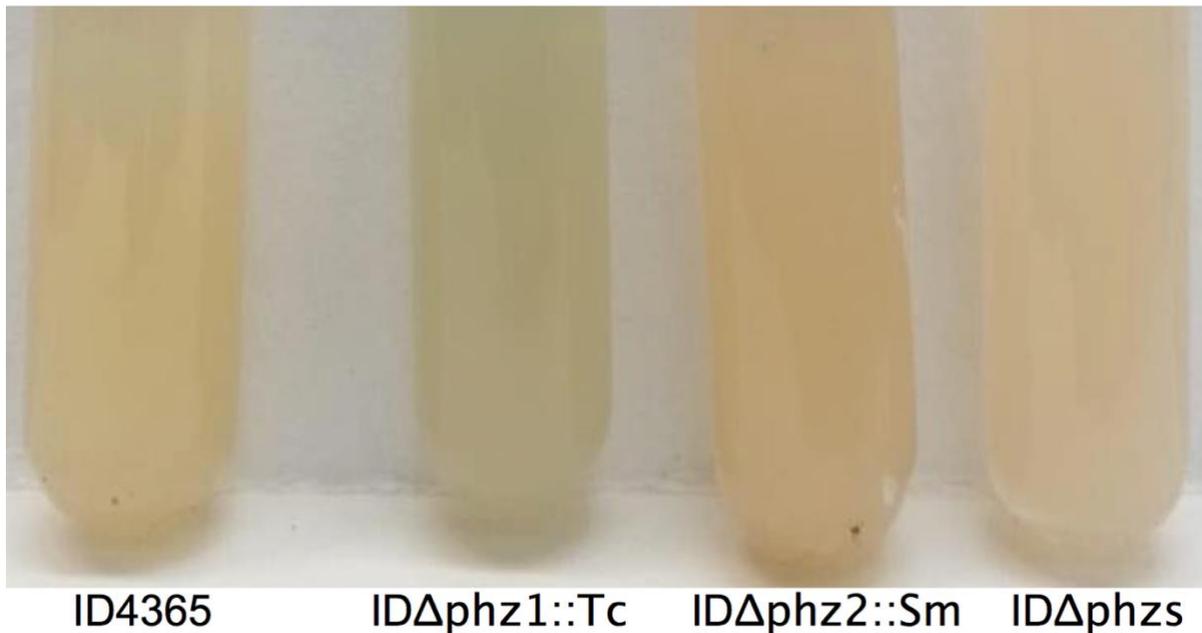
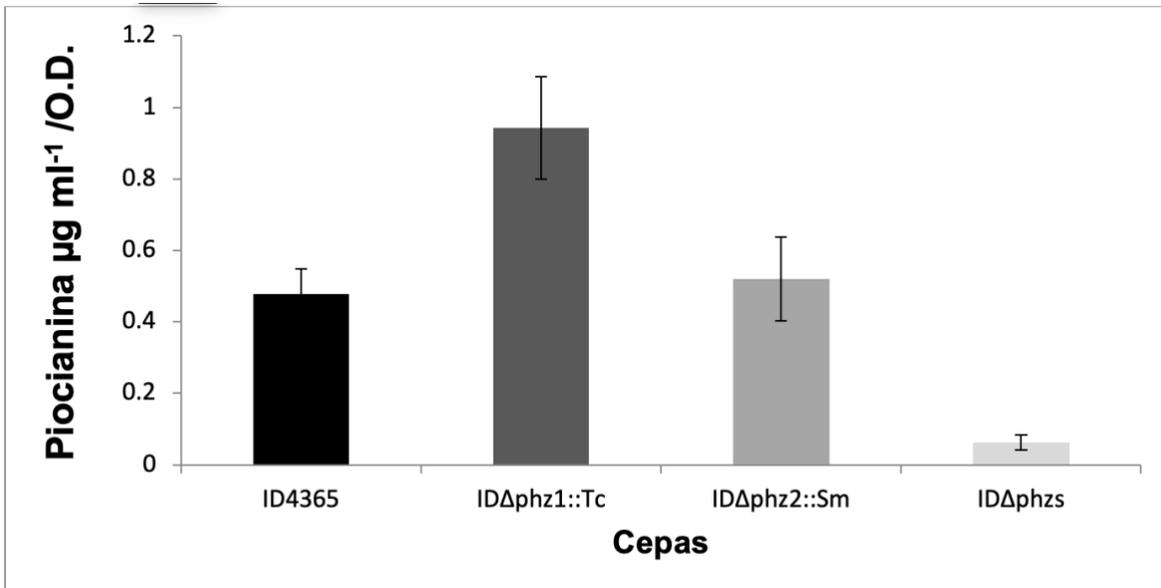


Figura 14. Sobrenadantes de las cepas ID4365, ID Δ phz1::Tc, ID Δ phz2::Sm e ID Δ phzs en medio LB a 30 °C. Los sobrenadantes mostrados corresponden a cultivos de 24 horas. Bajo estas condiciones de crecimiento resulta evidente la participación predominante del operón *phzA2-G2* en la cepa ID Δ phz1::Tc en comparación con la mutante sencilla ID Δ phz2::Sm y la cepa silvestre ID4365.

Con el fin de verificar que la producción de piocianina en la mutante ID Δ phz1::Tc es mayor que la cepa silvestre o en la mutante en el operón *phzA2-G2*, piocianina cuando se crece en medio LB a 30 °C, se realizó la extracción de este metabolito a partir de los sobrenadantes para la evaluación cuantitativa por densidad óptica. El análisis de tres repeticiones biológicas permitió determinar la aportación específica de piocianina. La evaluación de la cepa ID Δ phz2::Sm, cuya biosíntesis de piocianina es dada por *phzA1-G1*, permitió determinar que la síntesis de piocianina corresponde a la misma cantidad de piocianina sintetizada por la cepa silvestre ID4365. Por otro lado, la evaluación de la síntesis de piocianina dada por la cepa ID Δ phz1::Tc, cuya biosíntesis corresponde a *phzA2-G2*, mostró un aumento de casi el doble respecto a la cepa silvestre ID4365. Así mismo, estos resultados sugieren que en ausencia del operón *phzA1-G1* el operón *phzA2-G2* se sobreexpresa, lo cual se refleja en una mayor producción de piocianina con respecto a la cepa silvestre y con la cepa mutante ID Δ phz2::Sm. Por otro lado, la producción de la cepa ID Δ phz2::Sm exhibe la misma cantidad de piocianina que la cepa ID4365 lo cual sugiere que la expresión del operón *phzA1-G1* es suficiente para mantener los niveles de piocianina, dados por la cepa silvestre bajo estas condiciones. Finalmente, como se esperaba, al evaluar la actividad dada por la doble mutante ID Δ phzs se obtuvo una nula biosíntesis de piocianina, lo cual indica que a pesar de tener una baja actividad biosintética, tanto las mutantes sencillas como la cepa silvestre poseen actividad. Estos datos se ven reflejados en la gráfica 1.



Gráfica 1. Contribución de los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* en la síntesis de piocianina en medio LB a 30 °C. La cepa ID Δ phz1::Tc exhibe incremento de piocianina de ~97%, casi el doble en comparación con la cepa silvestre, lo cual puede ser debido a una mayor expresión del operón *phzA2-G2*. Por otro lado, la cepa ID Δ phz2::Sm exhibe la misma cantidad de piocianina que la cepa ID4365 lo cual sugiere que la expresión basal del operón *phzA1-G1* es suficiente para mantener los niveles de piocianina dados por la cepa silvestre. Las barras de error muestran la desviación estándar de triplicados biológicos.

Con la finalidad de determinar si el medio en el cual se crecen las bacterias influye en la síntesis de piocianina, se evaluó la producción de este compuesto a partir de los sobrenadantes de la cepa silvestre ID4365, las mutantes sencillas ID Δ phz1::Tc, ID Δ phz2::Sm y la doble mutante ID Δ phzs en PPGAS, un medio bajo en fosfatos. Visualmente, el medio PPGAS es más eficiente, en comparación con el medio LB, para promover la síntesis de piocianina. En este ensayo se determinó que la cepa ID4365 presenta una mayor síntesis de piocianina. Por otro lado, se determinó que ambas mutantes sencillas, ID Δ phz1::Tc y ID Δ phz2::Sm, presentan una marcada reducción en la síntesis de piocianina, con respecto a la cepa silvestre ID4365 (Figura 15.). Mostrando que estímulos externos, tal como el medio de cultivo, son factores importantes que afectan la producción de la síntesis de este factor de virulencia en particular. A pesar de la evidente disminución de piocianina sintetizada en ambas mutantes sencillas, la cepa ID Δ phz1::Tc muestra el mayor decremento

en comparación con la cepa silvestre ID4365. Lo anterior señala que, en medio PPGAS a 30 °C, el operón *phzA1-G1* aporta mayormente en la síntesis de piocianina en comparación con la actividad biosintética del operón *phzA2-G2*.

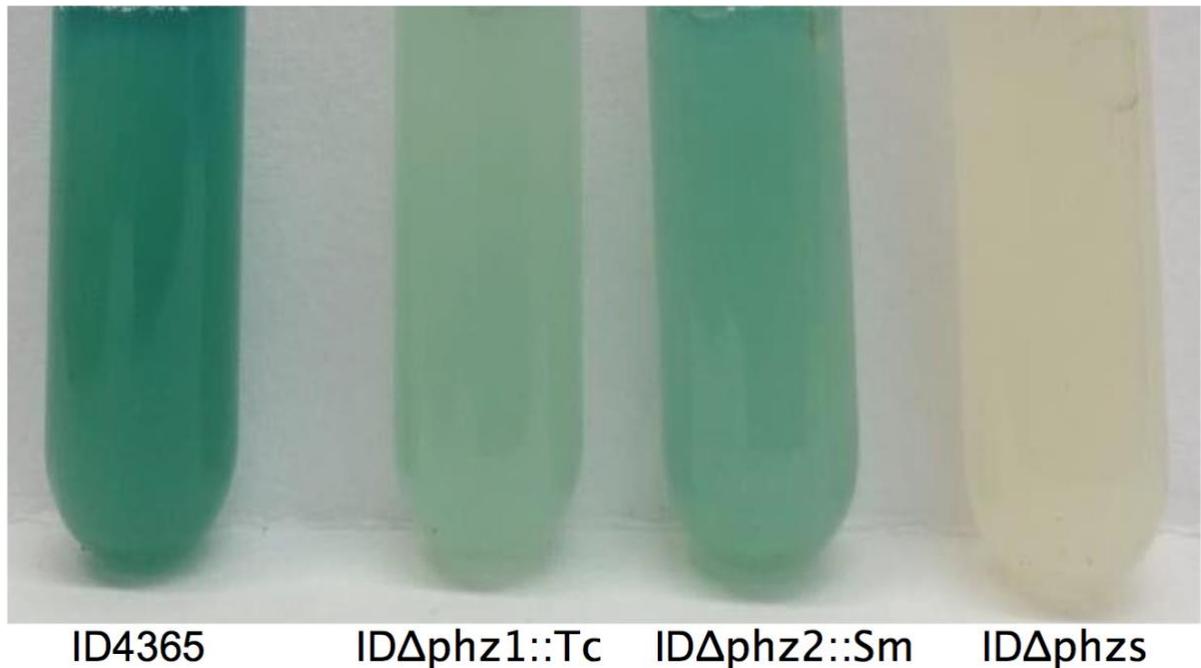
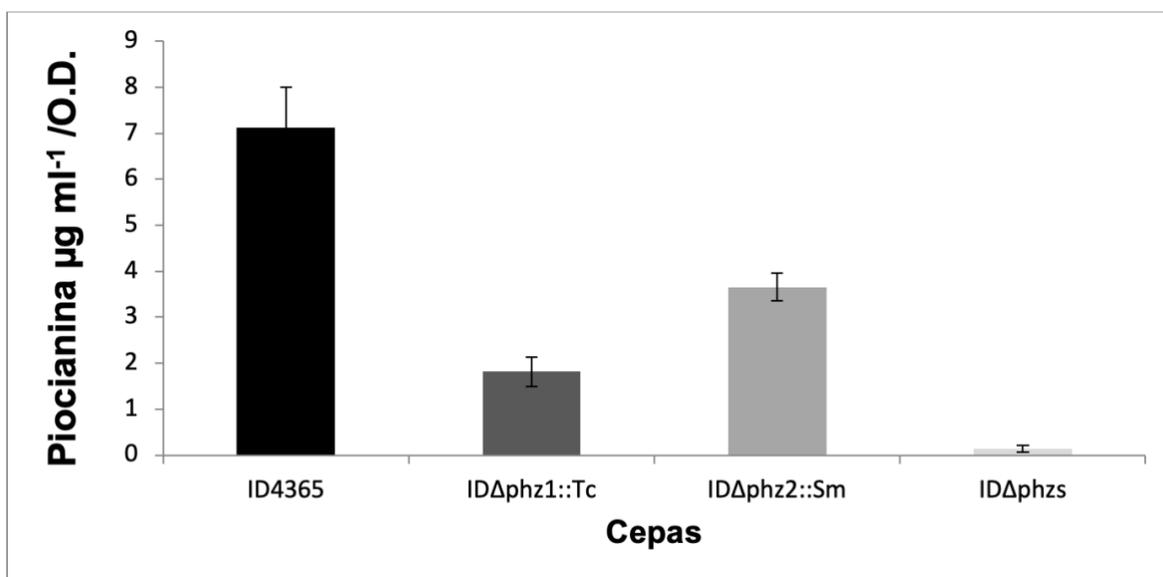


Figura 15. Sobrenadantes de las cepas ID4365, IDΔphz1::Tc, IDΔphz2::Sm e IDΔphzs en medio PPGAS a 30 °C. Los sobrenadantes mostrados corresponden a cultivos de 24 horas. Ambas mutantes; IDΔphz1::Tc y IDΔphz2::Sm muestran una reducción en la síntesis de piocianina, siendo IDΔphz1::Tc la cepa que muestra una mayor afectación en comparación con la cepa silvestre ID4365.

Con el objetivo de verificar que la síntesis de piocianina es dada principalmente por el operón *phzA1-G1* en medio PPGAS, se extrajo y se cuantificó la piocianina presente en los sobrenadantes de la cepa silvestre ID4365, las mutantes sencillas IDΔphz1::Tc y IDΔphz2::Sm así como de la doble mutante IDΔphzs. El análisis de tres repeticiones biológicas permitió determinar la aportación en la síntesis de piocianina dada por cada operón. Los resultados obtenidos indican que, a diferencia del medio LB, en medio PPGAS ambos operones, *phzA1-G1* y *phzA2-G2*, producen de forma significativa, menos piocianina que la cepa silvestre ID4365. Si bien, ambos operones aportan a la síntesis de piocianina, el operón *phzA1-G1* aporta

más en la síntesis de este compuesto, ya que al inactivar este operón la síntesis de piocianina se reduce en ~75% en comparación con la cepa silvestre ID4365, mientras que la reducción de las fenazinas en la mutante ID Δ phz2::Sm se redujo sólo un 49% aproximadamente (Gráfica 2.). Sin embargo, aun con la considerable reducción en la síntesis de piocianina ambas mutantes sencillas mantienen una producción de piocianina alta en comparación con la producción dada en medio LB a la misma temperatura y periodo de tiempo. Por otro lado, la actividad dada por la doble mutante, ID Δ phzs mostró una nula biosíntesis de piocianina.



Gráfica 2. Medición de piocianina en medio PPGAS a 30 °C. La cepa ID Δ phz1::Tc exhibe decremento de piocianina del ~75% y la cepa ID Δ phz2::Sm exhibe un decremento del ~49% en comparación con la cepa silvestre ID4365.

6.5 Evaluación de la producción de piocianina en LB y PPGAS a 37 °C

A pesar de que se ha caracterizado que la cepa ambiental ID4365 presenta una alta producción de piocianina a 37 °C, la temperatura ideal para la producción de este compuesto es 30 °C. Con el objetivo de realizar una evaluación comparativa, entre diferentes medios de cultivo y temperaturas, y determinar cómo estos factores influyen en la síntesis de piocianina, se cuantificó su producción en medio rico LB y medio bajo en fosfatos PPGAS, durante 24 horas a 37 °C, para compararlos con los

datos previamente obtenidos a 30 °C en este estudio. Al igual que los ensayos realizados previamente, se consideró la cepa silvestre ID4365 como control positivo y la doble mutante ID Δ phzs como control negativo.

La evaluación de piocianina presente en los sobrenadantes de la cepa silvestre ID4365, las mutantes sencillas ID Δ phz1::Tc e ID Δ phz2::Sm y en la doble mutante ID Δ phzs se realizó a las 24 horas de incubación a 37 °C, en medio LB. Tal como se muestra en la figura 16, se observa que la producción de piocianina incrementa, esto en comparación con los sobrenadantes de las mismas cepas crecidas a 30 °C. La producción de piocianina dada por las mutantes sencillas, ID Δ phz1::Tc e ID Δ phz2::Sm, muestra un decremento similar en ambos casos. Esto, en comparación con la cepa silvestre ID4365. Lo anterior sugiere que bajo las condiciones antes mencionadas ambos operones aportan de la misma forma en la síntesis de piocianina, tal como ha sido descrito en la cepa PAO1 (Figura 16.).

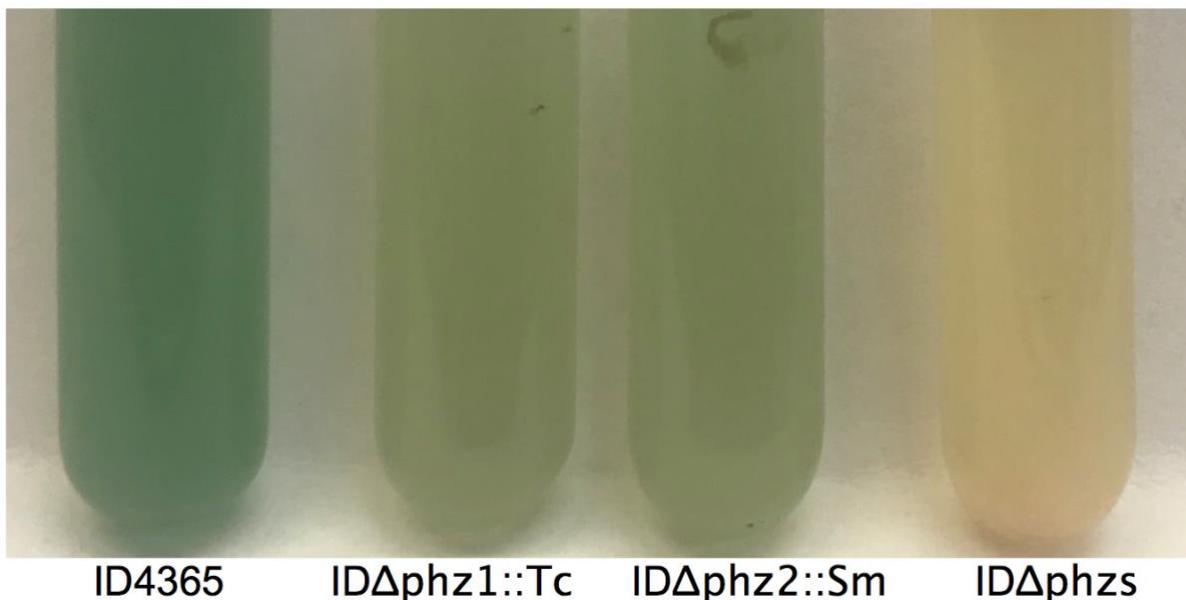
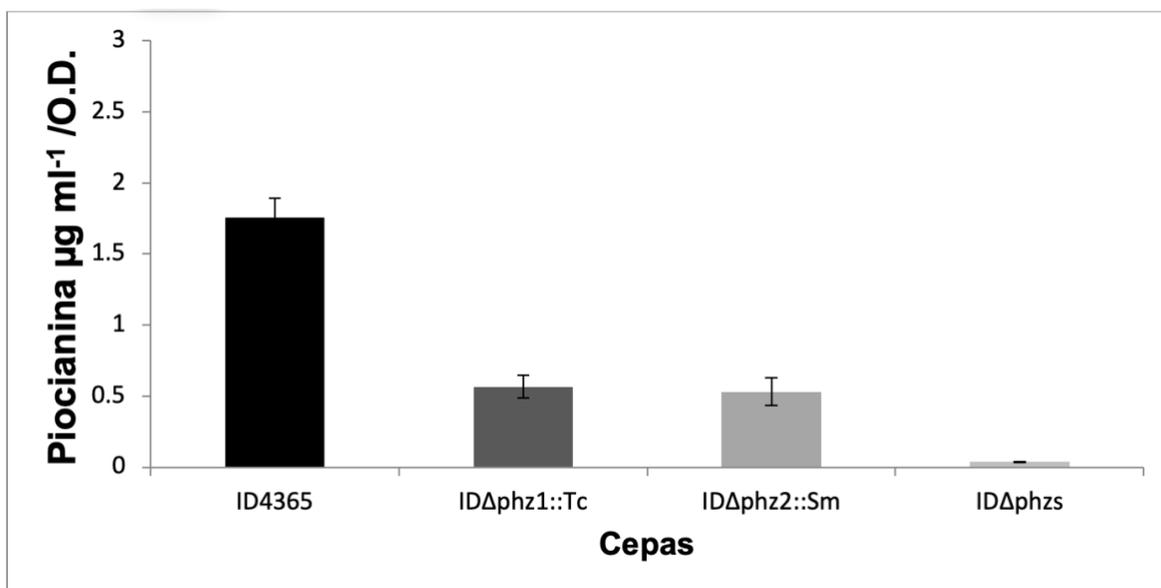


Figura 16. Sobrenadantes de las cepas ID4365, ID Δ phz1::Tc, ID Δ phz2::Sm e ID Δ phzs en medio LB a 37 °C. Los sobrenadantes mostrados corresponden a cultivos de 24 horas. Es posible identificar una aportación similar dada en la cantidad de piocianina sintetizada por el operón *phzA1-G1* en la cepa ID Δ phz2::Sm y por el operón *phzA1-G1* en la cepa ID Δ phz2::Sm.

Con el objetivo de verificar que la aportación en la síntesis de piocianina es dada por ambos operones de manera equitativa, en medio LB a 37 °C, se extrajo y cuantifico la piocianina presente en los sobrenadantes de la cepa silvestre ID4365, las mutantes sencillas ID Δ phz1::Tc y ID Δ phz2::Sm así como de la doble mutante ID Δ phzs. El análisis de tres repeticiones biológicas permitió determinar la aportación de piocianina dada por cada uno de los operones de forma individual. Así, se determinó que la síntesis de piocianina dada por las cepas ID Δ phz1::Tc e ID Δ phz2::Sm se reduce en un ~69% en ambos casos. Por lo cual, es posible determinar que los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* aportan de la misma forma en la síntesis de piocianina en medio LB a 37 °C (Gráfica 3.). Cabe destacar que, sustentado en las evaluaciones realizadas en este estudio, existe una mayor aportación de piocianina dada por los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* a 37 °C en medio LB en comparación con los datos obtenidos a 30 °C evaluadas en el mismo medio. Lo anterior corrobora que la temperatura ideal de síntesis de piocianina dada por la cepa ambiental ID4365 en medio rico LB es 37 °C.



Gráfica 3. Medición de piocianina en medio LB a 37 °C. La cepa ID Δ phz1::Tc exhibe decremento de piocianina del ~68% y la cepa ID Δ phz2::Sm exhibe un decremento del ~70% en comparación con la cepa silvestre ID4365.

Finalmente, con el objetivo de determinar la influencia en la síntesis de piocianina dada por el medio PPGAS a 37 °C, se evaluaron los sobrenadantes de la cepa silvestre ID4365, las mutantes sencillas ID Δ phz1::Tc, ID Δ phz2::Sm y la doble mutante ID Δ phzs. La evaluación visual realizada únicamente en los sobrenadantes permitió determinar que el medio PPGAS es más eficiente, en comparación con el medio LB, para promover la síntesis de piocianina. Lo anterior resulta evidente al comparar la intensidad azul verdosa típica de las colonias mostradas en este estudio. Cabe destacar que ambas mutantes sencillas, ID Δ phz1::Tc y ID Δ phz2::Sm, mostraron una marcada reducción en la síntesis de piocianina con respecto a la cepa silvestre ID4365 (Figura 17.). A pesar de la evidente disminución de piocianina en ambas mutantes sencillas, la cepa ID Δ phz1::Tc muestra el decremento más dramático en comparación con la cepa silvestre ID4365. Lo anterior sugiere que el operón *phzA1-G1* aporta más en la síntesis de piocianina que el operón *phzA2-G2* en medio PPGAS a 37 °C.

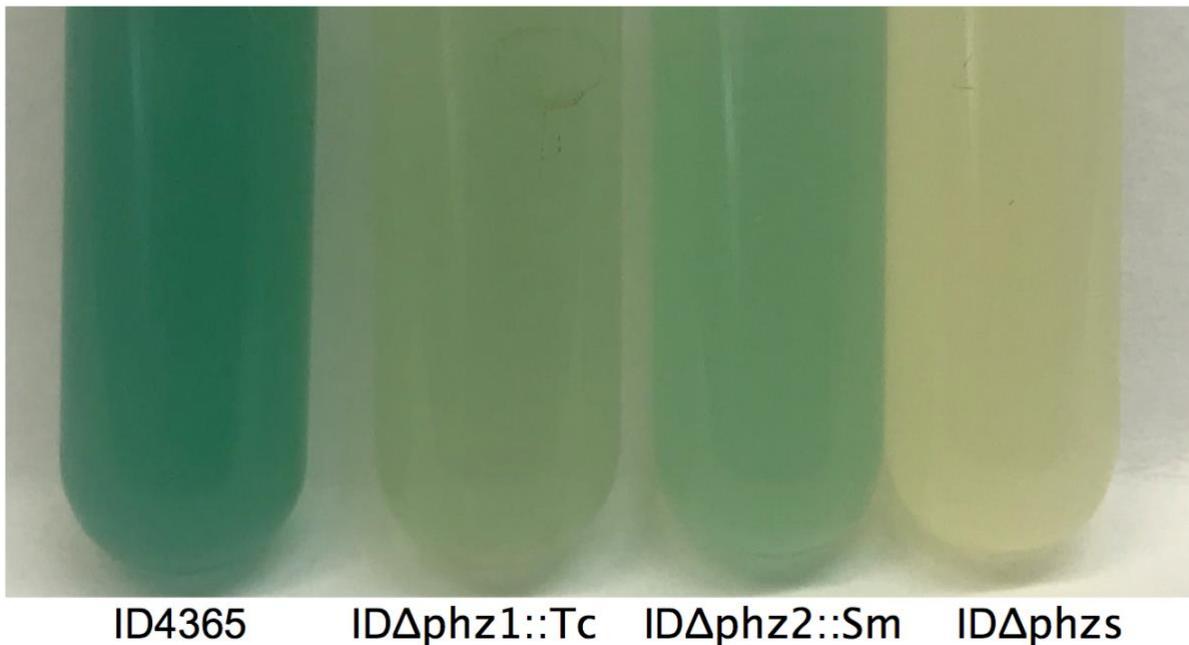
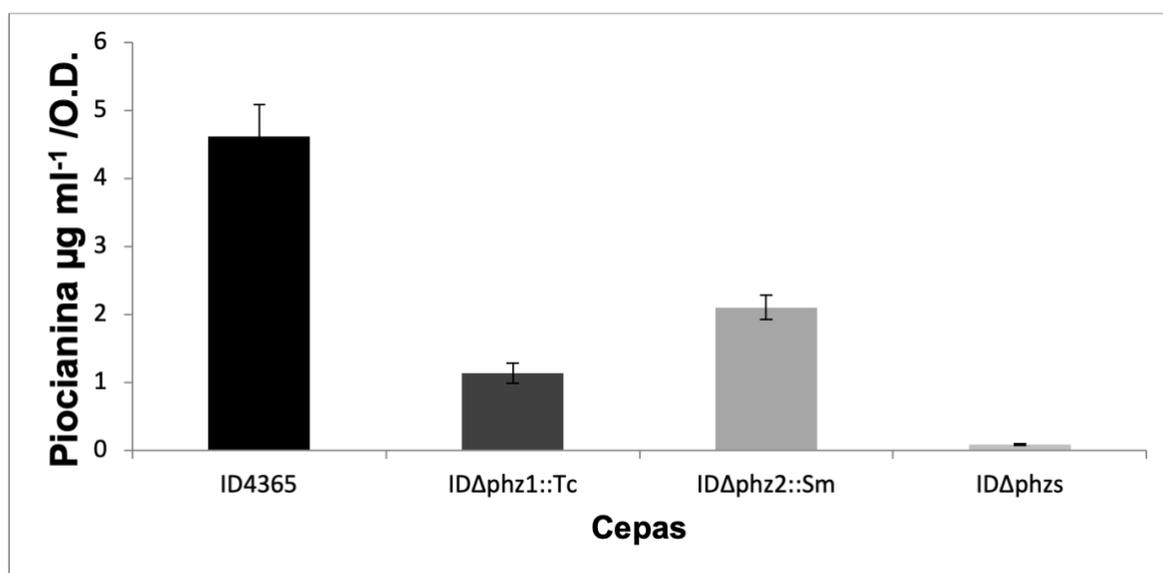


Figura 17. Sobrenadantes de las cepas ID4365, ID Δ phz1::Tc, ID Δ phz2::Sm e ID Δ phzs en medio PPGAS a 37 °C. Los sobrenadantes mostrados corresponden a cultivos de 24 horas. La cepa ID Δ phz1::Tc muestra un mayor efecto negativo en la síntesis de piocianina en comparación con la cepa silvestre ID4365

Con el objetivo de verificar que la aportación en la síntesis de piocianina es dada principalmente por el operón *phzA1-G1* en medio PPGAS a 37 °C, se purificó y cuantificó la piocianina presente en los sobrenadantes de la cepa silvestre ID4365, las mutantes sencillas ID Δ phz1::Tc y ID Δ phz2::Sm así como de la doble mutante ID Δ phzs. A partir del análisis de tres repeticiones, se determinó la aportación en la síntesis de piocianina.

Los resultados obtenidos indican que, a diferencia del medio LB, en medio PPGAS ambos operones, *phzA1-G1* y *phzA2-G2*, producen significativamente menos piocianina que la cepa silvestre ID4365. Si bien, ambos operones aportan a la síntesis de este compuesto, el operón *phzA1-G1* aporta más en la síntesis de piocianina. Al inactivar el operón *phzA1-G1* en la cepa ID Δ phz1::Tc la síntesis de este factor de virulencia se reduce en ~75% en comparación con la cepa silvestre ID4365 mientras que la mutación del operón *phzA2-G2* redujo su producción en un 55% (Gráfica 4.). Sin embargo, aun con la considerable reducción en la síntesis de piocianina ambas mutantes sencillas mantienen una producción de piocianina alta en comparación con la producción dada en medio LB a la misma temperatura y periodo de tiempo. Finalmente, al evaluar la actividad dada por la doble mutante, ID Δ phzs, se obtuvo una nula biosíntesis de esta fenazina.



Gráfica 4. Medición de piocianina en medio PPGAS a 37 °C. La cepa ID Δ phz1::Tc exhibe decremento de piocianina del ~75% y la cepa ID Δ phz2::Sm exhibe un decremento del ~55% en comparación con la cepa silvestre ID4365.

7 Discusión

Estudios realizados por Li *et al.*, (2011), Huang *et al.*, (2009) y Recinos *et al.*, (2012), han demostrado que la expresión diferencial de genes reiterados, tal como los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* evaluados en este estudio, confieren ventajas selectivas. Al poseer la misma función en la síntesis de fenazinas, se ha considerado que la importancia de los operones reiterados radica en la regulación y expresión variable la cual que depende directamente de los estímulos ambientales y/o del origen clínico o ambiental de la cepa. Este fenómeno de regulación diferencial ha sido estudiado a través de la síntesis de piocianina en las cepas PAO1 y PA14, dos aislados clínicos altamente patógenos. Se ha documentado que esta característica de expresión y regulación diferencial, dada por los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2*, no solo permite ampliar los estímulos a los que responde la bacteria, si no que, al mismo tiempo permite la diversificación de cepas a través de la adaptación a diversos nichos. Por ello, en este trabajo determinamos la aportación de cada operón en la sobreproducción de piocianina en la cepa ID4365 crecida en dos medios diferentes de cultivo y dos temperaturas.

Un claro ejemplo de esto es la actividad registrada por los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* en las cepas PAO1 e ID4365 realizada por Santos-Medellín *et al.*, (2012). En su tesis de maestría, el equipo de investigación registro que, en comparación con la cepa PAO1, la cepa ID4365 posee una actividad transcripcional del operón *phzA1-G1* más elevada que el operón *phzA2-G2* en medio PPGAS a 37 °C. Al comparar los datos obtenidos por Santos-Medellín *et al.*, con los datos obtenidos en este estudio es posible corroborar que el operón *phzA1-G1* es quien aporta más en la síntesis de piocianina y no el operón *phzA2-G2* en medio PPGAS. Así, es posible refutar la hipótesis inicial planteada en el presente estudio, en la que se planteó que

el operón *phzA2-G2* era el que presentaba un aporte mayor en la síntesis de piocianina, tal como Recinos *et al.*, (2012) ha reportado en la cepa PA14, una cepa perteneciente al mismo clado de la cepa ID4365, esto al menos en las condiciones probadas en este estudio.

Los resultados obtenidos en este estudio señalan que el medio PPGAS es ideal para la producción de piocianina, puesto que los fenotipos y las cuantificaciones de piocianina en este medio fueron superiores en comparación con los resultados obtenidos a partir de los sobrenadantes del medio LB, cuyo valor máximo fue de 1.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a 37 °C en la cepa silvestre ID4365. Si bien el medio PPGAS estimula la producción de piocianina, es evidente que la temperatura ideal para la síntesis de este compuesto es a 30 °C, como se muestra en las gráficas 2 y 4, la síntesis de piocianina a esta temperatura llega a ser de 7.1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, superior en comparación a la síntesis de este compuesto a 37 °C que fue de 4.6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en la cepa silvestre ID4365. Por otro lado, el comportamiento de las mutantes sencillas presentó un patrón de síntesis de piocianina variable. El cultivo de las mutantes sencillas ID Δ phz1::Tc e ID Δ phz2::Sm en medio LB a 37 °C, mostró un comportamiento en que en ambas cepas muestran la reducción en la síntesis de piocianina en ~69% en comparación con la cepa silvestre ID4365. Lo anterior, es el comportamiento típico descrito en la cepa PAO1 en el cual, Cui *et al.*, (2016) determinan que al inactivar cualquiera de los operones *phzABCDEFG* la síntesis se reduce de la misma forma, pero manteniendo siempre un nivel de producción por cualquiera de los operones. Por lo tanto, es posible que el control de la síntesis de piocianina de la cepa ID4365 en medio LB a 37 °C presente un tipo de regulación cruzada entre los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* que asegura un nivel equilibrado en la síntesis de fenazinas, tal como ha sido descrito por Cui *et al.*, para la cepa PAO1 (2016) y corroborado, hasta cierto punto, por los datos obtenidos en este estudio. Sin embargo, se sabe que el patrón de producción de piocianina no es estable y que cepas de diversos orígenes presentan comportamientos diversos.

A excepción de la cepa ID Δ phz1::Tc, la cual alcanzó una concentración de piocianina de 0.9 $\mu\text{g ml}^{-1}$, en medio LB a 30 °C, se determinó que en este medio ninguna de las mutantes sencillas excede una concentración de piocianina de 0.6 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Aunado a lo anterior, se determinó que la actividad biosintética de la cepa ID Δ phz1::Tc en medio LB a 30 °C incrementa en un ~97%, casi el doble en comparación con la cepa silvestre, lo cual puede ser debido a una mayor expresión del operón *phzA2-G2*. Por otro lado, se demostró que la cepa ID Δ phz2::Sm exhibe la misma cantidad de piocianina que la cepa ID4365 lo cual sugiere que la expresión del operón *phzA1-G1* es suficiente para mantener los niveles de piocianina dados por la cepa silvestre. Adicionalmente, se determinó que el medio LB es poco eficiente para la síntesis de piocianina. Por otro lado, en medio PPGAS a 30 °C y 37 °C el operón *phzA1-G1*, activo en la cepa ID Δ phz2::Sm, mostró la aportación más importante en la síntesis de piocianina en comparación con la mutante sencilla ID Δ phz1::Tc. Sin embargo, la actividad de la síntesis de este compuesto, dado por el operón *phzA1-G1*, concuerda con los datos obtenidos por Santos-Medellín *et al.*, en los cuales se reporta que la mayor actividad transcripcional es dada principalmente por el operón *phzA1-G1*. Como se mencionó antes, al construir los plásmidos que portan la mutación para inactivar los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2*, se verificó la viabilidad de las construcciones por medio de una secuenciación. Al realizar el alineamiento de la región intergénica entre los genes *phzG1-phzS* se pudo identificar la presencia de 82 pb extras, los cuales no se encuentran en la cepa PAO1, M18 ni PA14. Lo anterior sugiere que a pesar del hecho que el genoma de *P. aeruginosa* se encuentra altamente conservado entre las diversas cepas, cambios en la secuencia de los genes o las secuencias inmediatas que flanquean cada gen pueden jugar un rol crucial en la regulación y la expresión de estos. Así mismo, podría ser posible que la actividad predominante del operón *phzA1-G1* en la cepa ID4365 en la síntesis de piocianina en medio PPGAS sea regulada, de alguna forma aún desconocida, por esta secuencia nucleotídica adicional y tal vez estar relacionado ya sea de forma directa o indirecta con la expresión predominante de piocianina en la mutante ID Δ phz2::Sm, otra posibilidad es que esta secuencia adicional que impacte en la expresión de *phzS* afectando así la biosíntesis de este

metabolito. Sin embargo, esta hipótesis debe ser revisada a detalle al comparar la actividad de los operones por sí solos en las mutantes sencillas ID Δ phz1::Tc e ID Δ phz2::Sm realizando la evaluación de la actividad transcripcional y traduccional con el fin de evaluar si esta región adicional de 82 pb posee algún papel en la síntesis de piocianina en la cepa ID4365.

8 Conclusiones

El presente trabajo nos permitió determinar la aportación en la síntesis de piocianina, dada por los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* en la cepa ambiental ID4365. Las conclusiones más importantes a las que se llega son:

- A diferencia de otras cepas, clínicas y/o ambientales, en la cepa ID4365 los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* poseen una gran actividad biosintética de piocianina, sobretodo en medio bajo en fosfatos PPGAS a 30 °C.
- Contrario a lo reportado para la cepa PA14, el operón *phzA1-G1* en la cepa ID4365 es quien aporta más en la síntesis de piocianina, sobretodo en medio PPGAS a 30 °C y 37 °C.
- En medio LB a 30 °C la inactivación del operón *phzA1-G1* produce mas piocianina en comparación con la cepa silvestre o la mutante en el operón *phzA2-G2* sugiriendo que el primer operón se sobre expresa; mientras que a 37 °C ambos operones aportan en la misma proporción.
- A pesar de que cepas como M18, PA14, PAO1 e ID4365 poseen una alta identidad en sus genomas, la síntesis de piocianina dada por los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* no solo es dependiente de las condiciones oxigénicas y/o anoxigénicas, como lo han reportado Recinos *et al.*, (2012) en la cepa PA14 y Cui *et al.*, (2016) en la cepa PAO1, si no también de factores como la temperatura y la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo.

9 Perspectivas

- Realizar la complementación de las mutantes ID Δ phz1::Tc e ID Δ phz2::Sm así como medir la producción de PCA en estas mismas condiciones de cultivo.
- Medir la actividad transcripcional de cada uno de los operones en las diferentes mutantes y en las diferentes condiciones de cultivo.

10 Bibliografía

Balasubramanian D., Schneper L., Kumari L., MatheeK., (2013). A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Nucleic Acid Res. 41(1):1-20.

Bassler B.L. (2002). Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. Cell. 194:421-424.

Bergen G.A., Shelhamer.J.H. (1996). Pulmonary infiltrates in the patient. New approaches to an old problem. Infect Dis Clin North Am. 10:297-325.

Bertani I., Rampioni G., Leoni L., Venturi V. (2007). The *Pseudomonas putida* lon is involved in N-acyl homoserine lactone quorum sensing regulation. BMC Microbiol. 7:71.

Bilal M., Guo S., Iqbal., N.M.H., Hu H., Wang W., Zhang X. (2017). Engineering *Pseudomonas* for phenazine biosynthesis, regulation, and biotechnological applications: a review. World J Microbiol and Biotechnol. 33:191.

Bodey G.P., Bolivar R., Fainstein V., Jadeja L. (1983). Infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev infect Dis. 5(2):279-313.

Brewer S.C., Wunderik R.G., Leeper K.V., (1996). Ventilator associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Chest 109: 1019-1029.

Britigan E.B., Rasmussen T.G., Cox D.C. (1997). Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. Infect Immun. 65(3):1071-1076.

Bushnell D., Passador L., Brooks A.I., Iglewski B.H. (2004). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulons: effects of growth phase and environment. J Bacteriol. 185:2080-2095.

Cabeen T.M. (2014). Stationary phase-specific virulent factor over production by a *lasR* mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One. 9(2):e88743.

Calhoun D.H., Carson M., Jensen R.A. (1972). The branch point metabolite for pyocyanine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Microbiol. 72:581-583.

Chugani S. A., Whiteley M., Lee K. M., D'Argenio D., Manoil C., Greenberg E. P. (2001). QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 98, 2752–2757.

Cogen A.L., Nizet V., Gallo R.L. (2009). Skin microbiota: a source of disease or defence?. Br J Dermatol. 158(3):442-455.

Conway S.P., Brownlee K.G., Denton M., Peckham D.G., (2003). Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. Am J Respir Med. 2(4):321-32.

Cui Q., Huinan L., Zhuangzhuang Q., Jiang B., Xiao B., Liu L., Ge Y., Hu X. (2016). Cross-Regulation between the *phz1* and *phz2* operons maintain a balanced level of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. PLoS ONE 11(1): e0144447..

De Kievit T., Kakai Y., Register J. K., Pesci E. C., Iglewski B. H. (2002). Role of the *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in *rhlI* regulation. FEMS Microbiol Lett. 212:101–106.

Denning G.M., Railback M.A., Rasmussen G.T., Cox C.D., Britigan B.E. (1998). *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human air way epithelial cells. Am J Physiol. 274:L893-L900.

Dietrich L.E., Okegbe C., Price-Whelan A., Sakhtah H., Hunter R.C., Newman D.K. (2013). Bacterial community morphogenesis is intimately linked to the intracellular redox state. J Bacteriol. 195: 1371-1380.

Dietrich L.E., Prince-Whelan A., Petersen N.A., Whiteley M., Newman D.K. (2006). The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol. 61:1308-1321.

Diggle S.P., Winzer K., Chhabra S.R., Worrall K.E., Camara M., Williams P. (2003). The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. Mol. Microbiol. 50: 29-43.

Drees L.S. & Fetzner S. (2015). PqsE of *Pseudomonas aeruginosa* acts as pathway-specific thioesterase in the biosynthesis of alkylquinolones signaling molecules. Chem Biol. 22(5):611-618.

Drenkard E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 5(13):1213-1219.

Dropulic L.K., Leslie J.M., Eldred L.J., Zenilman J., Sears C.L. (1995). Clinical manifestations and risk factors of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with AIDS. *Int J Infect Dis.* 17(4):930-937.

Dulcey E. C., Valérine D., Fauvelle D.A., Milot S., Groleau M.C., Doucet N., Laurence G.R., Lépine F., Déziel E. (2013). The end of an old hypothesis: The *Pseudomonas* signaling molecules 4-hydroxy-2-alkylquinolones derive from fatty acids, not 3-ketofatty acids. *Chem Biol.* 20(12):1438-1440.

Eschbach M., Schreiber K., Trunk K., Buer J., Jahn D., Schobert M. (2004). Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *J Bacteriol.* 186: 4596-4604.

Farrow J.M., Sund Z.M., Ellison M.L., Wade D.S., Colemann J.P., Pesci E.C. (2008). PqsE functions independently of PqsR-*Pseudomonas* quinolone signal and enhances the *rhl* quorum-sensing system. *J Bacteriol.* 190 (21): 7043-51.

Fuqua C., Winans S.C., Greenberg E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.* 176 (2): 269-275.

Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. (2001). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcription regulators. *J Bacteriol.* 176:269-275.

Gallagher L.A., McKnight M.S., Kuznetsova M.S., Pesci E.C., Manoil C. (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 184(23): 6472-6480.

García-Reyes S., Soberón-Chávez G., Cocotl-Yanez M. (2020). The third quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. J Med Microbiol. 69(1): 25-34.

Gessard C. (1884). Sur les colorations bleues et vertes des linges a pansements. C.R. Acad. Sci. Hebd. Seances. Sci. 94:536-538.

Gilbert K.B., Kim T.H., Gupta R., Greenberg E.P., Schuster M. (2009). Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing transcription factor Las R. Mol Microbiol. 73(6): 1072-1085.

Goldberg J.B., Pier. (2000). *Pseudomonas* global bacteria. Trends in Microbiol. 8:55-57.

Greenhagen B.T., Shi K., Robinson H., Gamage S., Bera A.K., Lader J.E., Parsons J.F. (2008). Crystal structure of pyocyanin biosynthetic protein PhzS. Biochemistry 47(1):5281-5289.

Grosso-Becerra M.V., Santos Medellín C., González-Valdez A., Méndez J.L., Delgado G., Morales-Espinosa R., Servín-González L., Alcaraz L.D., Soberón-Chávez G. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. BMC genomics, 15(1):318.

Guo S., Wang Y., Dai B., Wang W., Hu H., Huang X., Zhang X. (2017). *phzA*, the shunt switch of phenazine-1,6-dicarboxylic acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* HT66. Appl Microbiol Biotechnol. 101:7165-7175.

Hammer A.S., Pedersen K., Andersen T.H., Jorgensen J.C., Dietz H.H. (2003). Comparison of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from milk by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol.* 94:237-243.

Hardalo C., & Edberg S.C., (1997). *Pseudomonas aeruginosa* assessment of risk from drinking water. *Crit rev Microbiol.* 23:47-57.

Hazan R., He J., Xiao G., Dekimpe V., Apidianakis Y., Lesic B., Astrakas C., Déziel E., Lépine F., Rhame L.G. (2010). Homeostatic interplay between bacterial cell-cell signaling and iron in virulence. *PLoS Pathog.* 6 (3): e1000810.

Heeb S., Matthew P.F., Ram C.S., Diggle P. S., Williams P., Cámara M. (2011). Quinolones: from a antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol Rev.* 35(2): 247-274.

Hogan D.A., Kotler R. (2002). *Pseudomonas-Candida* interaction: an ecological role for virulence factors. *Sci.* 296: 2229-2232.

Huang J.F., Xu Y.Q., Zhang H.Y., Li Q., Huang Q, Ren B., Zhang X. (2009). Temperature-dependent expression of *phzM* and its regulatory genes *LasI* and *ptsP* in rhizosphere isolate *Pseudomonas* sp. Strain M18. *Appl Environ Microbiol.* 75(20): 656-6580.

Jander G. Rahme L.G., Ausubel. F.M. (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol.* 182:3843-3845.

Jeykumari D.R.S., Narayanan S.S. (2007) Covalent modification of multiwalled carbon nanotubes with neutral red for the fabrication of an amperometric hydrogen peroxide sensor. *Nanotechnology* 18:125501–125510.

Kamath J.M., (1995). Pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* inhibit prostacyclin release from endothelial cells. *Infect Immun.* 63: 4921-4923.

Kievit T., Seed C.P., Nezezon J., Passador L., Iglewsky H.B. (1999). RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 181(7): 2175-2184.

Konkel M.E., Tilly K. (2000). Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect.* 2:157-166.

Lau W.G., Hassett J.D., Ran H. And Kong F. (2014). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Elsevier.* 10(12): 599-606.

Lau W.G., Hassett J.D., Ran H., Kong F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med.* 10(12):599-606.

Lazdunski A.M., Ventre I., Sturgis J.N. (2004). Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol.* 2:581-592.

Ledgham F., Ventre I., Soscia C., Foglino M., Sturgis J. N., Lazdunski A. (2003). Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol. Microbiol.* 48, 199–210.

Lee J.H., Lequette Y., Greenberg E.P. (2006). Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor. *Mol Microbiol.* 59(2):602-609.

Lequette Y., Lee J. H., Ledgham F., Lazdunski A., Greenberg E. P. (2006). A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *J. Bacteriol.* 188, 3365–3370.

Li Y., Du X Lu Z.J., Wu D., Zhao Y., Ren B., Jiaofang H., Xianqing H., Yuhong X., Yuquan X. (2011). Regulatory feedback loop of two *phz* gene clusters through 5'-untranslated regions in *Pseudomonas* sp. M18. PLoS ONE. 6(4): e19413.

Ling H., Duan J., Sibley C.D., Surette M.G., Duan K. (2011). Identification of mutants with altered phenazine production in *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol. 60:22-34.

Livermore D. (2001). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: our worst nightmare?. Clin Infect Dis. 34:634-640.

Longley R. P., Halliwell J. E., Campbell J. J. R., Ingledew W. M. (1972). The branchpoint of pyocyanin biosynthesis. Can J Microbiol. 18(9): 1357-1363.

Lu J.N., Tappel R.C., Nomura C.T. (2009). Mini-review: biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). Polym Revt 49:226–248.

Mahajan-Miklos S. Tan M.W., Rahme L.G., Ausubel. F.M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis* pathogenesis model. Cell. 96;47-56.

Manwar A.V., Khandelwal S.R., Chaudhari B.L., Meyer J.M., Chincholkar S.B. (2004). Siderophore production by a marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. Appl Biochem Biotechnol. 118; 243-251.

Mavrodi D.V. Blankenfeldt W., Thomashow L.S. (2006). Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. Biosynthesis and regulation. Annu Rev Phytopathol. 44:417-445.

Mavrodi D.V., Bonsall R.F., Delaney S.M., Soule M.J., Phillips G., Thomashow S.L., (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* 183:6454-6465.

Mavrodi D.V., Peever T.L., Mavrodi O.V., Parejko J.A., Raaijmakers J.M., Lemanecau P., Mazurier S., Heide L., Blankenfeldt W., Weller D.M., Thomashow L.S. (2010). Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway. *Appl Environ Microbiol.* 76(3): 866-879.

Mavrodi V.D., Ksenzenko N.V., Bonsali F.R., Cook J.R., Boronin M.A., Thomashow S.L. (1998). A seven gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J Bacteriol.* 108(9): 2541-2548.

McKnight S.L., Iglewski B.H., Pesci E.C. (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 182: 2702-2708.

Medina G., Juárez K., Díaz R., Soberón-Chávez G. (2003). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhIR, encoding *Quorum sensing* regulatory protein. *Microbiol.* 149(11):3073-3081.

OMS. (2019). Carbapenem—resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection- Mexico. Disease outbreak news. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312105/WER9417-210-212.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Palleroni N.J. (1984). Genus I. *Pseudomonas* Migula. *In*: Kreig N. R. and Holt J.G. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, MA. 141-199.

Parsons J., Greenhagen B.T., Shi K., Calabrese K., Robinson H., Lader J.E. (2007). Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthesis protein *phzM* from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem.* 46(7):1821-1828.

Pham T.H., Boon N., De Maeyer K., Hofte M., Rabaey K., Verstraete W. (2008). Use of *Pseudomonas* species producing phenazine-based metabolites in the anodes of microbial fuel cells to improve electricity generation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 80:985–993.

Pierson L.S., Pierson E.A. (2010). Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86:1659-1670.

Pirnay J.P., Bilocq F., Pot B., Cornelis P., Zizi M., Eldere V.J., Deschaght P., Vaneechoutte M., Jennes S., Pitt T., De Vos D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* population structure revised. *PLoS.* 4(11): e7740.

Price-Whelan A., Dietrich E.L., Newman K.D. (2007). Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol.* 189(17): 6372-6381.

Rabaey K., Boon N., Hofte M., Verstraete W. (2005). Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuel cells. *Environ Sci Technol.* 39:3401–3408.

Rahme L. G., Stevens E.J., Wolfort S.F., Shao J., Tomkins R.G., Ausubel F.M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science.* 268: 1899-1902.

Rampioni G., Bertani I., Zennaro E., Polticelli F., Venturi V., and Leoni L. (2006). The quorum-sensing negative regulator RsaL of *Pseudomonas aeruginosa* binds to the *lasI* promoter. *J Bacteriol.* 188: 815–819.

Rampioni G., Falcone M., Heeb S., Frangipani E., Fletcher P. M., Dubern F.J., Visca P., Leoni L., Camara M., Williams P. (2016). Unravelling the genome-wide contribution of specific 2-alkyl-4-quinolones and PqsE to Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog. 12(11): e1006029.

Rampioni G., Pustelny C., Fletcher P.M., Wright J.V., Bruce M., Rumbaugh P.K., Heeb S., Camara M., Williams P. (2010). Transcriptomic analysis reveals a global alkyl-quinolone-independent regulatory role for PqsE in facilitating the environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to plant and animal hosts. Environ Microbiol. 12(6): 1659-1673.

Rampioni G., Schuster M., Greenberg P.E., Bertani I., Grasso M., Venturi V., Zennaro E., Leoni L. (2007). RsaL provides quorum sensing homeostasis and function as global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol. 66(6):1557-1565.

Recinos D.A., Sekedat M.D., Hernandez A., Cohen T.S., Sakhtah H., Prince A.S. (2012). Redundant phenazine operons in of *Pseudomonas aeruginosa* exhibit environment-dependent expression and differential roles in pathogenicity. Proc Nat Sci U.S.A. 109:19420-19425.

Recinos D.A., Serekedat M.D., Hernández A., Cohen T.S., Sakhtah H., Prince A.S., Price-Whelan A., Dietrich L.E.R.(2012). Redundant phenazine operons in *Pseudomonas aeruginosa* exhibit environment-dependent expression and differential roles in pathogenicity. Proc Natl Acad Sci USA.

Richards M.J., Edwards J.R., Culver D.H., Gaynes R.P. (1999). Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States: Nation Infections Surveillance System. Crit Care Med. 27: 887-892.

Ruby E.G. (1996). Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri-Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu Rev Microbiol.* 50: 591-624.

Rumbaugh K.P., Griswold J.A., Glewski B.H., Hamood A.N., (1999) Contribution of *Quorum Sensing* to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun.* 67:5854:5862.

Ryazanova O.A., Voloshin I.M., Makitruk V.L., Zozulya V.N., Karachevtsev V.A. (2007). pH-induced changes in electronic absorption and fluorescence spectra of phenazine derivatives. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc.* 66:849–859.

Schuster M., Lostroh C.P., Ogi T., Greenberg E.P. (2003). Identification, timing and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol.* 185: 2066-2079.

Schuster M., Sexton D.J., Diggle S.P., Greenberg E.P. (2013). Acyl-homoserine lactone quorum sensing: from evolution to application. *Annu Rev Microbiol.* 67:43-63.

Schuster M.,Lostroh C.P.,Ogi T., Greenberg E.P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome análisis. *J. Bacteriol.*, 185:2066-2079.

Silby W.M., Winstanley C., Godfrey A.C.S., Levy B.S., Jackson W.R. (2001). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev.* 35(4): 652-680.

Smith R.S., Iglewski B.H. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing system and virulence. *Curr Opin Microbiol.* 6:56-60.

Sorensen J., Rasmussen L.K., Koike I. (1987). Micromolar sulfide concentrations alleviate acetylene blockage of nitrous oxide reduction by denitrifying *Pseudomonas fluorescens*. Can J Microbiol. 33(11):1001-1005.

Spliker T., Coenye T., Vandamme P., LiPuma J.J., (2004) PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomona aeruginosa* species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 42(5): 2074-2079.

Sun S., Chen B., Jin Z., Zhuo L., Fang Y.L., Thawai C. (2017). Characterization of multiple molecular mechanisms underlying RsaL control phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis in the rhizosphere bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201. Mol Microbiol. 104:931-947.

Sun S., Zhuo L., Jin K., Jiang H., He Y.W. (2016). Quorum sensing systems differentially regulate the production of PCA in rhizobacterium of *Pseudomonas aeruginosa* PA1201. Sci Rep. 6: 30352.

Trunk K., Benkert B., Quäck N., Münch R., Scheer M., Garbe J. (2010). Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. Environ. Microbiol. 12: 1719-1733.

Venturi V. (2006). Regulation of *quorum sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Rev. 30(2):274-291.

Von Bodman S.B., Bauter W.D., Coplin D.L. (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. Annu Rev Phytopathol. 41:455-482.

Wade D.S., Calfee M.W., Rocha E.R., Ling E.A., Engstorm E. Coleman J.P., Pesci E.C. (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 187: 4372-4380.

Wade D.S., Calfee M.W., Rocha E.R., Ling E.A., Engstrom E., Coleman J.P., Pesci E.C. (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 187: 4372-4380.

Wagner V.E., Bushnell D., Passador L., Brooks A.L., Iglewsky B.H. (2003). Microarray analysis of of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulons: effects of growth pase and environment. J Bacteriol. 185: 2080-2095.

Whitehead A.N., Bernard L.M.A., Slater H., Simpson J.L.N., Salmond P.C.G. (2001). Quorum Sensing in gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev. 25:365-404.

Whiteley M., Greenberg E.P. (2001). Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing controlled genes. J Bacteriol. 183: 5529-5534.

Williams P & Cámara M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. Elsevier. 12(2): 182-191.

Winsor G.L., Lam D.K., Flemming L., Lo R., Whitside M.D., Yu N.Y. (2011). Pseudomonas genome database: improved comparative análisis and population genomics capability for Pseudomonas genomes. Nucleic Acids Res. 39 (Data base issue):D596-600.

Wurtzel O., Yoder- Himes D.R., Han K., Dandekar A.A., Edelheit S., Greenberg E.P., Sorek R., Lory S. (2012). The single.nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body temperature. PLoS Pathogens. 8(9):e1002945.

Xiao G., He J., Rhame L.G. (2006). Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrate complex quorum-sensing circuitry. Microbiology. 152:1679-1686.

