



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**Efecto de las mutaciones en los reguladores transcripcionales  
LasR y PqsR del sistema de detección de quórum, en la síntesis  
de factores de virulencia de la cepa *Pseudomonas aeruginosa*  
ATCC 9027**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MTRA.SELENE GARCÍA REYES**

DIRECTORA DE TESIS:

**DRA.GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS,UNAM

COMITÉ TUTOR

**DR.LUIS SERVÍN GONZÁLEZ**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS,UNAM

**DR.JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, marzo de 2021



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.

## **Agradecimientos**

A mi asesora Dra. Gloria Soberón, gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, guiarme en el planteamiento de nuevas hipótesis y enseñarme que la investigación es una forma de vida que nos mantiene activos y creativos. Gracias, por demostrarme que uno puede lograr lo que se proponga con empeño.

A los integrantes de mi comité tutorial, Dr. Luis Servín y José Adelfo Escalante, quienes me acompañaron durante estos cuatro años, gracias por sus comentarios y aportaciones al proyecto, que sin duda han sido de gran importancia para el planteamiento de experimentos interesantes.

A mis maestros, Dra. Abigail González, Dr. Miguel Cocotl y Dra. Estefanía Morales, por su disponibilidad en capacitarme, brindarme sus enseñanzas y consejos, los cuales me permitieron realizar con éxito todos mis experimentos durante el doctorado.

A mi esposo Fidel A. Aguilar, que, con su apoyo, amor, paciencia y consejos, fortalecieron en todo momento mis pasos durante el posgrado, etapa tan importante en mi formación académica.

A mi madre Elsa Luz Reyes y hermanas, Lorena García y Viridiana García, gracias por brindarme su apoyo incondicional durante mis estudios de posgrado, sin duda cuando uno sale de casa aprende varias cosas, una de ellas es que la familia siempre está con nosotros.

A mi abuela Sra. Consuelo Cervantes, gracias, por haber prestado tu oído para escuchar mis alegrías y mis tristezas. Infinitas gracias, por tus consejos y enseñanzas. Por siempre a tu memoria, cada uno de mis logros.

A mis compañeros del laboratorio, Martín Soto, Fernando Montelongo y Sara Quiroz, por volver las horas de trabajo experimental más divertidas, sin duda, aventuras inolvidables, momentos llenos de hipótesis, charlas interesantes y nuevas ideas.

## Contenido

Agradecimientos .....	2
Abreviaciones. ....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	8
1. Introducción. ....	9
1.1. El sistema de detección de quórum en la bacteria <i>P. aeruginosa</i> . ....	9
1.2. Regulación de la síntesis de factores de virulencia por el sistema de DQ.....	14
1.3. Características de los factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> .....	16
1.4. Características del clado PA7 o grupo 3 de <i>P. aeruginosa</i> .....	18
2. Antecedentes. ....	20
3. Justificación.....	21
4. Hipótesis. ....	22
5. Objetivos. ....	22
5.1. General.....	22
5.2. Específicos.....	22
6. Materiales y métodos.....	23
6.1. Material biológico y medios de cultivo. ....	23
6.2. Métodos utilizados para estudiar la mutación del regulador transcripcional LasR en la cepa <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027. ....	24
6.2.1. Construcción de los plásmidos para sobreexpresar LasR, y cuantificar los promotores <i>lasB</i> y <i>rhIR</i> .....	24
6.2.2. Cuantificación de los factores de virulencia. ....	25
6.2.2.1. Cuantificación de la actividad elastolítica de la elastasa LasB.....	25
6.2.2.2. Detección de la producción de ramnolípidos mediante cromatografía de capa fina. ....	25
6.2.3. Detección de la proteína LasR por Western blot.....	26
6.2.4. Cuantificación de la expresión de los promotores <i>lasB</i> y <i>rhIR</i> . ....	27
6.3. Métodos utilizados para estudiar la mutación del regulador transcripcional PqsR en la cepa <i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027.....	27
6.3.1. Construcción de los plásmidos para sobreexpresar <i>pqsR</i> y <i>pqsE</i> . ....	27
6.3.2. Construcción de las mutantes <i>pqsR</i> y <i>pqsE</i> de la cepa PAO1.....	28
6.3.3. Construcción de la mutante <i>pqsE</i> de la cepa ATCC 9027.....	29
6.3.4. Detección de la producción de las quinolonas PQS/HHQ utilizando un biosensor.....	29

6.3.5. Cuantificación de la producción de piocianina y ramnolípidos. ....	30
6.3.6. Determinación de la expresión de <i>pqsE</i> por transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR).....	30
6.3.6.1 Ensayo preliminar para la detección de la presencia de un autoinductor sintetizado por PqsE. ....	31
6.3.7. Detección de la proteína RhIR por Western blot. ....	32
6.3.8. Cuantificación de la expresión de los promotores de <i>rhIR</i> . ....	33
7. Resultados y discusión.....	33
7.1. Resultados y discusión del estudio de la mutación de LasR de la cepa <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 9027. ....	33
7.1.1. Análisis de la secuencia de aminoácidos del sistema Las de la cepa ATCC 9027.....	33
7.1.2. Síntesis de la proteína LasR de la cepa ATCC 9027 en medio LB.....	38
7.1.3. La proteína LasR de la cepa ATCC 9027 no es funcional como regulador transcripcional. ....	39
7.1.4. La producción de ramnolípidos depende de la presencia de una proteína LasR funcional. ....	41
7.1.5. Análisis y expresión del promotor <i>lasB</i> de la cepa PAO1 y ATCC 9027....	45
7.1.6. Análisis y expresión del promotor <i>rhIR</i> de la cepa PAO1 y ATCC 9027. ...	47
7.2. Resultados y discusión del estudio de la mutación de <i>pqsR</i> de la cepa <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 9027. ....	50
7.2.1. La cepa ATCC 9027 tiene una proteína PqsR no funcional. ....	50
7.2.2. La cepa ATCC 9027 es capaz de sintetizar piocianina de manera independiente a PqsR cuando es cultivada en medio PPGAS. ....	54
7.2.2.1. La síntesis de piocianina en la cepa ATCC 9027 es parcialmente dependiente de la expresión de PqsE. ....	55
7.2.3. La sobreexpresión de <i>pqsE</i> causa un incremento de la concentración de RhIR que resulta en la sobreproducción de piocianina, pero no mejora la síntesis de ramnolípidos. ....	57
7.2.3.1 Estudio del papel de PqsE como regulador de la síntesis de piocianina en la cepa de referencia <i>P. aeruginosa</i> PAO1. ....	63
8. Conclusiones.....	65
9. Anexos.....	66
9.1. Listas de cepas y plásmidos utilizados.....	66
9.2. Alineamientos y esquemas.....	73
9.3. Resultados obtenidos durante la estancia de investigación.....	76
9.3.1.1 Construcción de plásmidos para sobreexpresar <i>cyaB</i> y <i>vfR</i> . ....	77

9.3.1.2. Cuantificación de factores de virulencia.....	78
9.3.1.3. Ensayo de virulencia en <i>G.mellonella</i> y ratón.....	78
9.3.2. Resultados. ....	79
9.3.2.1. Ensayo de virulencia en <i>G.mellonella</i> .....	79
9.3.2.2. Detección de la síntesis de ExIA. ....	80
9.3.2.3. Determinación de la síntesis de piocianina, elastasa y proteasas totales. .....	82
9.3.2.4. Ensayo preliminar de proteínas secretadas por la cepa ATCC 9027 sobreexpresando <i>vfR</i> y <i>cyaB</i> .....	84
9.3.2.5. Ensayo de virulencia en modelo de ratón.....	85
9.4. Artículo de investigación. ....	87
10. Bibliografía.....	89

## **Abreviaciones.**

RL: Ramnolípidos

ELA: Elastasa LasB

PIO: Piocianina

Mono-RL: Mono-ramnolípidos

Di-RL: Di-ramnolípidos

DQ: Detección de quórum

QS: Quórum sensing (QS)

PQS: 2-heptil-3-hydroxy-4-quinolona

HHQ: 2-heptil-4 quinolona

LB: Luria Bertani

PPGAS: Proteosa peptona/ glucosa/sal de amonio

D.O: Densidad óptica

pb: Pares de bases

## Resumen

La bacteria *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista capaz de sintetizar factores de virulencia como pirocianina, elastasa y ramnolípidos, los cuales utiliza para colonizar a su huésped.

La síntesis de estos factores de virulencia se encuentra finamente regulada por un mecanismo llamado detección de quórum y que responde a la densidad celular. Este mecanismo está conformado por tres sistemas: el sistema Las, el sistema Rhl y el sistema Pqs. Los cuales se encuentran interconectados. El sistema Las está en la cima de la jerarquía, ya que se encarga de activar la expresión los sistemas Rhl y Pqs. Sin embargo, se ha reportado que, en condiciones de bajo fosfato, la jerarquía del sistema de detección de quórum cambia, volviéndose independiente del sistema Las.

Esta especie se clasifica en cinco grupos filogenéticos, las cepas del grupo 1 y 2, representados por las cepas tipo PAO1 y PA14 han sido ampliamente estudiadas, mientras que actualmente se han comenzado a estudiar las cepas del grupo 3 del tipo PA7 ya que por sus características fenotípicas son un modelo ideal para estudiar la regulación de factores de virulencia en *P. aeruginosa*.

En esta tesis se estudió la regulación por el sistema de detección de quórum de los factores de virulencia de la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027 que pertenece al grupo 3 de *P. aeruginosa* bajo dos condiciones de cultivo, en medio rico Luria Bertani (LB) y en medio bajo en fosfatos (PPGAS).

Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que la cepa ATCC 9027 posee mutaciones en los reguladores transcripcionales LasR y PqsR que pertenecen a los sistemas de detección de quórum Las y Pqs respectivamente lo que repercutió en su síntesis de factores de virulencia cuando es cultivada en medio LB sin embargo, estas mutaciones no afectan la síntesis de estos factores de virulencia cuando es cultivada en medio PPGAS. Por lo que la cepa ATCC 9027 tiene un sistema de detección de quórum atípico con respecto a la cepa de referencia PAO1.

**Palabras claves:** *Pseudomonas aeruginosa*, sistema de detección de quórum, factores de virulencia.

## **Abstract**

The *P. aeruginosa* bacterium is an opportunistic pathogen that is capable of synthesizing virulence factors such as pyocyanin, elastase and rhamnolipids, that are used to colonize its host.

The synthesis of these virulence factors is finely regulated by a mechanism called quorum sensing and it responds to cell density. This mechanism is made up of the Las, Rhl and Pqs systems, which are interconnected. The Las system being at the top of the hierarchy, because it turns on the expression of the Rhl and Pqs system. However, it has been reported that, under low phosphate conditions, the hierarchy of the quorum sensing system changes, becoming independent of the Las system.

This bacterium is classified into five phylogenetic groups, the strains of group 1 and 2, represented by the PAO1 and PA14 type strains have been widely studied. On the other hand, the study of group 3 strains of the PA7 type is currently being studied, due to their phenotypic characteristics they are an ideal model to study the regulation of virulence factors in *P. aeruginosa*.

This work studies the regulation by the quorum detection system of the virulence factors of the *P. aeruginosa* ATCC 9027 strain, which belongs to group 3 of *P. aeruginosa*, It was studied under two culture conditions, in rich medium Luria Bertani (LB) and in a low phosphate medium (PPGAS).

The results obtained in this thesis showed that the ATCC 9027 strain has mutations in the transcriptional regulators LasR and PqsR that belong to the Las and Pqs quorum detection systems respectively, which had an impact on its synthesis of virulence factors when it is cultivated in LB medium. However, these mutations did not affect the synthesis of these virulence factors when it was cultured in PPGAS medium.

Therefore, the ATCC 9027 strain has an atypical quorum detection system with respect to the reference strain PAO1.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, quorum detection system, virulence factors.

## **1. Introducción.**

En la presente tesis doctoral, se estudió el efecto que causa la ausencia de los reguladores transcripcionales LasR y PqsR, sobre la regulación genética en la síntesis de los factores de virulencia: Píocianina (PIO), elastasa LasB (ELA) y ramnolípidos (RL) de la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027 (también llamada DSM1128), que pertenece al clado PA7 o grupo 3 de *P. aeruginosa*.

El estudio de cepas con un sistema de detección de quórum (DQ) atípico, como es el caso de la cepa ATCC 9027, contribuye a entender los mecanismos moleculares que utiliza este patógeno para establecer una infección en humanos, así como la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para su tratamiento.

### **1.1. El sistema de detección de quórum en la bacteria *P. aeruginosa*.**

Muchas bacterias se comunican entre sí, mediante el sistema de DQ, que involucra la producción, detección y respuesta de autoinductores (AI). Las bacterias Gram negativas utilizan como AI moléculas pequeñas, capaces de atravesar la membrana bacteriana, como por ejemplo las acil homoserina lactonas (AHL); En cambio, muchas bacterias Gram positivas, utilizan oligopéptidos como AI. El aumento en la concentración de AI depende directamente de la densidad celular (1).

Al entrar a las células, los AI se unen específicamente a proteínas que funcionan como reguladores de la transcripción y los activan. De esta manera, las bacterias regulan colectivamente la expresión génica de procesos como la bioluminiscencia, esporulación, síntesis de antibióticos, formación de biofilm o síntesis de factores de virulencia (FV), entre otros, dependiendo de la especie (1).

En 1970 se describió el sistema de DQ de la bacteria marina *Aliivibrio fischeri*, que sintetiza la enzima luciferasa cuando se incrementa la concentración de su AI en el medio, producto del incremento de la densidad celular, generando bioluminiscencia (2). Posteriormente, en diferentes microorganismos se describieron sistemas de DQ homólogos al de *A. fischeri*, incluyendo en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (3, 4).

*P. aeruginosa*, es una bacteria Gram negativa, ubicua, clasificada como un patógeno oportunista causante de infecciones nosocomiales; principalmente infecta a personas con una respuesta inmunológica deficiente, como es el caso, de individuos con cáncer, VIH, diabetes, pacientes postoperatorios o en terapia intensiva, trasplantados, con quemaduras o personas con fibrosis quística (5–7). También, han sido reportadas infecciones gastrointestinales, del tracto urinario y del torrente sanguíneo han sido reportados (8).

Para establecer una infección, *P. aeruginosa* produce diferentes proteínas y moléculas que utiliza como FV. Entre las más estudiadas se encuentran, la piocianina (PIO)(9), la elastasa LasB (ELA) (10) y los ramnolípidos (RL) (11). La síntesis de estos FV está regulada por el sistema de DQ de esta bacteria (12).

El sistema de DQ de *P. aeruginosa*, se compone de tres sistemas, el sistema Las, el sistema Rhl y el sistema Pqs (Fig. 1) (11, 13, 14).

En el sistema Las, el regulador transcripcional es la proteína LasR, que se une al AI N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (C12). El AI C12 es previamente sintetizado por la sintasa LasI, codificada en el gen *lasI*, mientras que LasR se encuentra codificada en el gen *lasR* (10). El sistema Rhl, está formado por el regulador transcripcional RhIR y el AI N-butilil-L-homoserina lactona (C4), y la síntesis de este AI está a cargo de la sintasa RhII. El regulador y la sintasa del AI C4 se encuentran codificados por los genes *rhIR* y *rhII*, respectivamente (15).

Las proteínas LasR y RhIR pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales tipo LuxR, los cuales reconocen secuencias palindrómicas específicas que se encuentran en el promotor de los genes a los que regulan. Estas secuencias se llaman cajas *lux* y tienen la siguiente secuencia consenso NNCT-(N)12-AGNN (16), en esta tesis llamaremos a estas cajas como secuencias *las-rhl*.

El tercer sistema de DQ es Pqs, el cual consta del regulador transcripcional PqsR, que es de la familia de LysR y del AI de tipo quinolona, 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) (17). La síntesis de PQS requiere de las proteínas codificadas en los operones *pqsABCDE* (*pqsA-E*) y *phnAB*, que son regulados positivamente por

PqsR/PQS y PqsR/HHQ, así como del gen *pqsH* (17, 18). El complejo PqsR/PQS reconoce la secuencia palindrómica consenso T-[N]<sub>11</sub>-A, una de ellas se encuentra ubicada en la posición -45 pb del sitio de inicio de la transcripción del operón *pqsA-E* (TTCGGACTCCGAA) (19), la otra se encuentra en el promotor del operón *phnAB* (TCCTGCCCGGCGA) (17). La expresión del gen *pqsH* es regulado de manera positiva por el complejo LasR/C12 (20).

El primer paso en la síntesis de PQS, consiste en la conversión del ácido corísmico en antranilato por acción de las antranilato sintasas PhnA y PhnB, el antranilato, es posteriormente transformado por la enzima PqsA (antranilato-CoA ligasa) en antraniloil-CoA. El siguiente paso consiste en la condensación del antraniloil-CoA con malonil-CoA por la acción de la proteína PqsD para formar 2-aminobenzoilacetil-CoA (2-ABA-CoA), el cual es hidrolizado por la tioesterasa PqsE para liberarlo de CoA, formando 2-aminobenzoilacetato (2-ABA). A continuación, el 2-ABA se condensa con octanoil-CoA por la actividad catalítica del heterodímero formado por las proteínas PqsB y PqsC (PqsBC), para formar a la molécula 2-heptil-4 quinolona (HHQ). Finalmente, HHQ se convierte en el AI PQS, al recibir un grupo hidroxilo por la acción de la monooxigenasa PqsH (21–23) (Fig. 26 del anexo 9.4). Una mutante *pqsA* o *pqsB* pierde la capacidad de sintetizar AI de tipo quinolona (24), ya que estas mutaciones impiden la expresión del operón *pqsA-E*, así mismo, una mutante *pqsR*, no sintetiza PQS debido a que la síntesis de las proteínas involucradas en la síntesis de este AI son regulados de manera positiva por esta proteína (24).

Se ha reportado que una mutante *pqsE* de la cepa PAO1 es capaz de sintetizar PQS y HHQ como la cepa WT, esto se debe a que *P. aeruginosa* posee además de PqsE, otra tioesterasa llamada TesB (acil-CoA tioesterasa II), que puede suplir la actividad de PqsE dentro de la síntesis de PQS, aunque con menor eficiencia. Experimentos realizados in vitro demostraron que PqsE y TesB fueron capaces de sintetizar 60 µM y 31 µM de 2-ABA, respectivamente, ambas utilizando 100 µM de sustrato (25). Otras tioesterasas han sido reportadas en esta bacteria, tal es el caso de PA5202 y PA2801 aunque no se ha demostrado que participen en la síntesis de PQS (26).

Adicionalmente, durante la síntesis del AI PQS, se forman otros tres metabolitos secundarios, 4-hidroxi-1H-quinolina (DHQ), 2-aminoactofenona (2-AA) y 2-heptil-1-hidroxiquinolina-4 (HQNO). La síntesis de DHQ, resulta de la condensación del antraniloil-CoA con el malonil-CoA por acción de la proteína PqsD (27). La formación de 2-AA se origina por la descarboxilación de 2-ABA (20, 28). Actualmente se sabe que la molécula 2-ABA puede convertirse en HQNO por la acción de las proteína PqsL y el heterodímero PqsBC (28) (Fig. 26 del anexo 9.4).

Si bien, DHQ, HQNO y 2-AA no actúan como AI en el sistema Pqs, se ha reportado que DHQ inhibe la viabilidad de las células epiteliales MLE-12 de pulmón de ratón contribuyendo de esta manera a la patogenicidad de *P. aeruginosa*, aunque el mecanismo por el cual ejerce esta función sin elucidarse (27). HQNO en cambio, es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, como un mecanismo de supervivencia cuando comparten el mismo nicho (29). El exoproducto 2-AA promueve los fenotipos de infección crónica de *P. aeruginosa* al silenciar las funciones de virulencia aguda como el sistema Las (30).

Los tres sistemas de DQ, Las, Rhl y Pqs se encuentran interconectados. El sistema Las se encuentra en la cima de la cascada de señalización; regula de manera positiva la expresión de los sistemas Rhl y Pqs. LasR/C12 activa la transcripción de los genes *rhIR* y *rhII*, así como de los genes *pqsR* y *pqsH* del sistema Pqs. Aunque el sistema Las regula de manera positiva la síntesis de PQS, se ha reportado que una mutante *lasR* de la cepa PAO1, es capaz de sintetizarlo en la fase estacionaria tardía (24h) de crecimiento, mientras que la cepa silvestre, sintetiza este AI en la fase estacionaria temprana de crecimiento (6h) en medio LB (31).

También se ha reportado que el sistema Rhl regula de manera negativa la expresión del sistema Pqs, ya que el promotor del operón *pqsA-E* tiene una caja *las-rhl*, que es reconocida por RhIR/C4 generando un RNA mensajero largo, con una estructura secundaria en la región 5'UTR y que evita su traducción, ya que oculta el sitio Shine-Dalgarno del RNA mensajero (32).

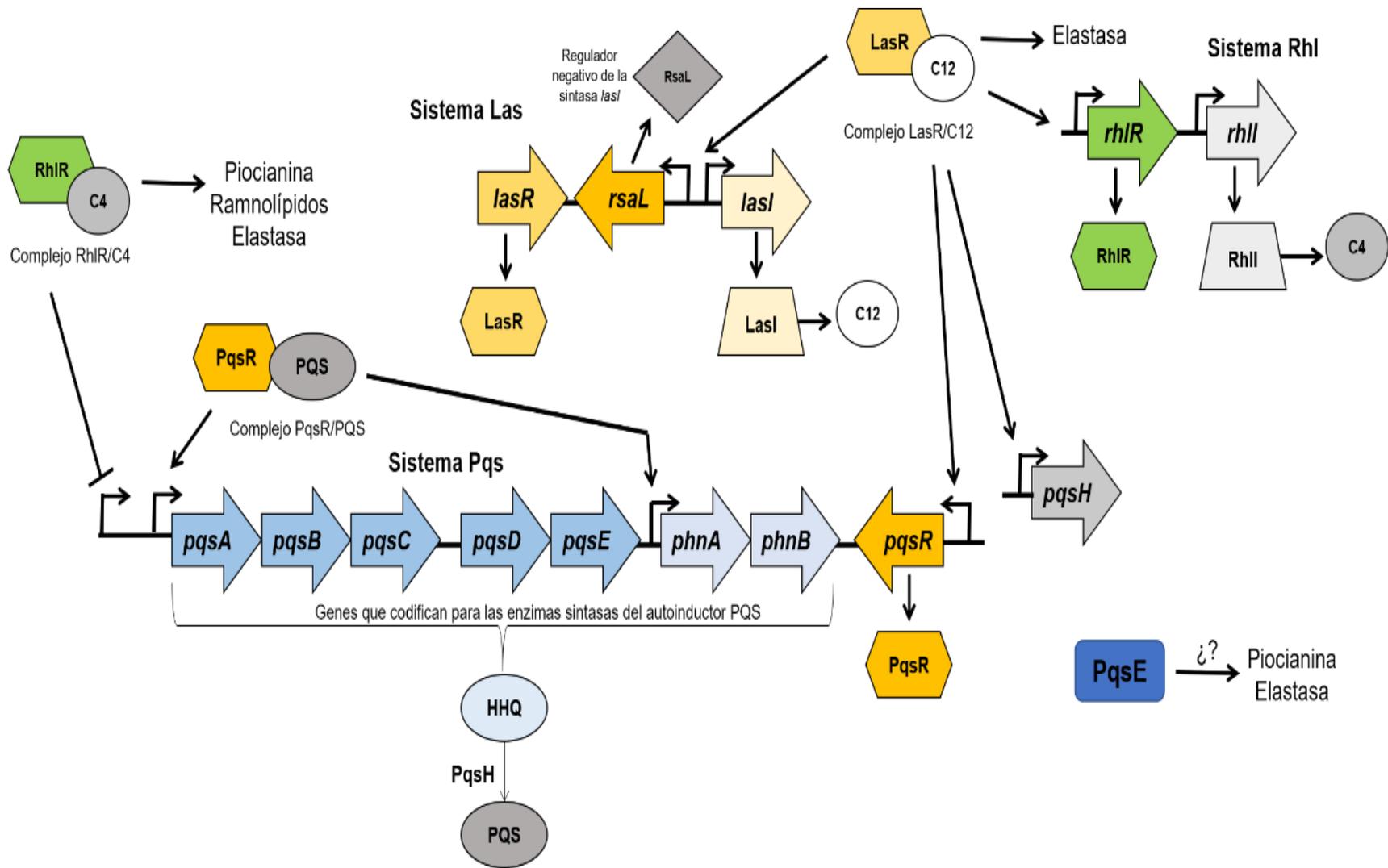


Figura. 1 Representación esquemática de del sistema de detección de quórum de *Pseudomonas aeruginosa*.

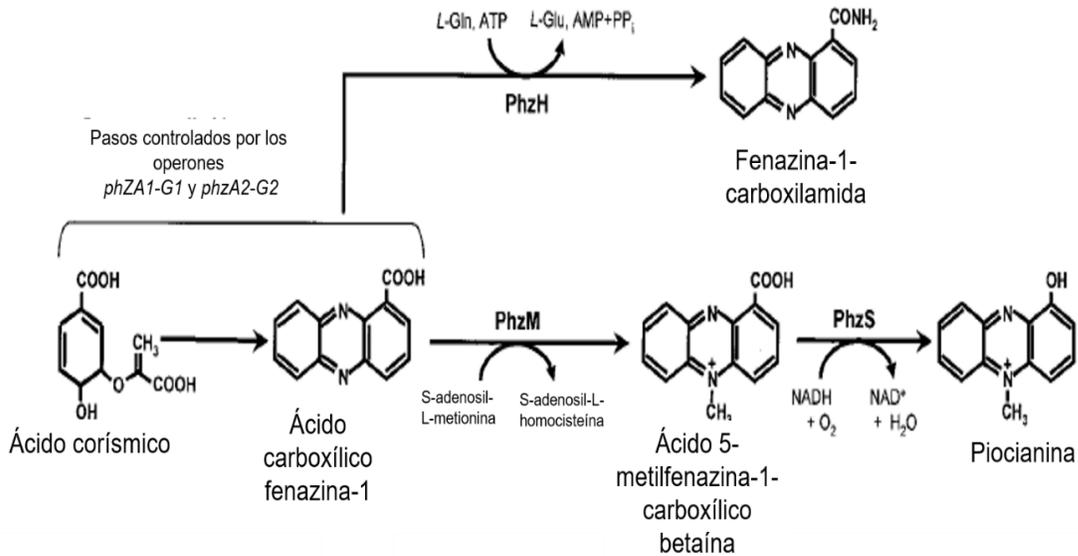
## 1.2. Regulación de la síntesis de factores de virulencia por el sistema de DQ.

Entre los FV más estudiados en *P. aeruginosa* se encuentran ELA (10), PIO (9) y RL (33). La regulación en la síntesis de los FV antes mencionados depende del sistema de DQ de esta bacteria (1).

El sistema Las, a través de LasR/C12, regula de manera positiva la transcripción del gen *lasB*, que codifica a la proteasa LasB (4, 11). Una mutante LasR de la cepa PAO1 es incapaz de sintetizar ELA cuando es cultivada en medio LB (34). Este FV tiene un rol crucial en la patogenicidad de *P. aeruginosa*; una mutante *lasB* disminuye su virulencia en el modelo de infección pulmonar de ratón (35). Adicional al sistema Las, se ha reportado que los sistemas Rhl (16) y Pqs (31, 36) regulan de manera positiva la síntesis de esta proteasa. Se propone que el mecanismo por el cual el sistema Pqs regula este FV es mediante la proteína PqsE a través del sistema Rhl, una mutante *rhlR* que sobreexpresa *pqsE* no restaura la síntesis de ELA, por el contrario, una mutante *pqsR* que sobreexpresa *pqsE* sobreproduce ELA (37). El promotor de *lasB* contiene dos cajas *las-rhl* llamados OP1 y OP2, donde LasR/C12 y/o RhlR/C4 pueden actuar como reguladores positivos de la transcripción (38–40).

La síntesis de PIO está regulada de manera directa por el sistema Rhl y en mutantes *rhlR* o *rhlI* se abate su síntesis (13). El complejo RhlR/C4, activa la expresión de dos operones reiterados *phZA1B1C1D1E1F1G1* (*phzA1*) y *phZA2B2C2D2E2F2G2* (*phzA2*), los cuales codifican a proteínas del mismo nombre y que transforman el ácido corísmico a fenazina-1-ácido carboxílico (PCA). Posteriormente, el PCA, es transformado por la proteína PhzM a 5-metilfenazina-1-ácido carboxílico betaína, molécula que finalmente se convierte a PIO mediante la acción de la enzima PhzS (Fig.2) (41). De ambos operones, únicamente el promotor de *phzA1*, tiene una secuencia *lasR-rhl* que es reconocida por RhlR (13, 16, 42). Aunque en el segundo operón no se ha encontrado esta secuencia también es regulado por el sistema Rhl. Se sabe que en una mutante *lasR* de la cepa PA14, el regulador transcripcional RhlR es el responsable de la activación tardía del operón *phzA1* (después de una

D.O 600<sub>nm</sub> de 4.0), mientras que en la cepa WT se observa la expresión de este promotor desde una D.O. 600<sub>nm</sub> de 2.5 (42).



**Figura. 2 Esquema de la síntesis de fenazinas de *P. aeruginosa* PAO1.** Figura modificada de Mavrodi et al. 2001.

Similar a una mutante *rhIR*, una mutante *pqsE*, que se encuentra en el operón *pqsA-E* (Fig.1), no sintetiza PIO, mientras que sí es capaz de sintetizar el AI PQS (20, 37). Actualmente se sabe que el papel del AI PQS junto con PqsR en la síntesis de PIO es inducir la síntesis de PqsE mediante la transcripción de todo el operón *pqsA-E*. Así pues, se ha reportado que en una mutante *pqsR* no se sintetizan las proteínas codificadas en *pqsA-E*, por lo que no se sintetiza PqsE y en consecuencia se abate la síntesis de PIO (37).

La regulación que ejerce PqsE sobre la producción de PIO no es de manera directa, ya que esta proteína no posee dominios de unión al ADN (43) sino que lo hace a través del sistema Rhl, ya que la sobreexpresión de *pqsE* en una mutante *rhIR* no restaura la síntesis de PIO (21, 37). Recientemente se reportó en la cepa *P. aeruginosa* PA14 que la proteína PqsE es importante para activar al sistema Rhl en ausencia del sistema Las y que su papel no consiste en sintetizar un AI para RhlR (42) como previamente había sido propuesto por Mukherjee et al. 2018.

Aunque se desconoce el papel de PqsE en la regulación de la síntesis de FV dependientes del sistema Rhl, se ha reportado como indispensable para la expresión del operón *phzA1* dependiente del sistema Rhl en una mutante *lasR* (42). Estudiar cual es el papel de la proteína PqsE en la síntesis de FV es importante, debido al gran número de reportes de aislados clínicos de *P. aeruginosa* que pese a ser mutantes *lasR*, cuentan con un sistema de DQ funcional, esto es que pueden sintetizar FV como la PIO en ausencia de LasR, como por ejemplo las cepas de *P. aeruginosa* mutantes *lasR* E113, E104, E92, E89, E186 y 148 (31, 44, 45).

Los RL son glicolípidos que poseen un dímero de ácidos grasos que unido a una molécula de ramnosa forman el mono-ramnolípido (mono-RL) y unido a dos moléculas de ramnosa forman el di-ramnolípido (di-RL). La síntesis de este FV depende de la expresión del operón *rhlAB* y del gen *rhlC* (46). La ramnosiltransferasa RhlC agrega la segunda unidad de ramnosa al mono-RL para producir el di-RL (47). *P. aeruginosa* se divide en 5 grupos filogenéticos, los que pertenecen al grupo 1, 2 y 4 sintetizan mono-RL y di-RL, pero los que pertenecen al grupo 3 y 5 solo sintetizan mono-RL ya que no cuentan con el gen *rhlC* (47, 48).

La expresión del operón *rhlAB* es controlada de manera positiva por el sistema Rhl. En una mutante *rhlR* o *rhlI* se abate la síntesis de RL, ya que RhlR unido al AI C4 es requerido para la expresión del operón de *rhlAB* (13, 33). También se sabe que una mutante *rhlI* que sobreexpresa *pqsE* es capaz restaurar parcialmente la síntesis de RL (37), una hipótesis es que la proteína PqsE puede estar participando a través de RhlR para activar la síntesis de RL en ausencia de C4 (37).

### **1.3. Características de los factores de virulencia de *P. aeruginosa*.**

Los FV son moléculas sintetizadas por las bacterias, que contribuyen a establecer una infección en el huésped (12). Por años, se ha estudiado la regulación y el modo de acción de los FV sintetizados por *P. aeruginosa*, en esta tesis se estudió la producción y regulación de la síntesis de PIO, ELA y RL.

El FV ELA, representa uno de los FV más estudiados ya que es la proteasa más abundante en esta bacteria; aproximadamente el 75% de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* son capaces de sintetizar este FV (35). La elastasa LasB, es una

metaloproteína de 33 kDa con actividad elastolítica (35), que se secreta por el sistema de secreción tipo II (T2SS) de *P. aeruginosa* (49). Esta bacteria posee cinco sistemas de secreción, se ha reportado que el T2SS es importante para la virulencia en el modelo de neumonía en ratón (50). Además de LasB, otros FV son secretados por el T2SS como exotoxina A, elastasa LasA, proteasa tipo IV y fosfolipasa H (50). La ELA, es capaz de degradar el colágeno tipo III y IV; componentes del sistema inmunológico innato y adaptativo como interferón- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ), interleucina-2 (IL-2) o proteína de activación de neutrófilos epiteliales (ENA-78), así como proteínas A y D (35), estas últimas son sintetizadas por las células epiteliales alveolares tipo II y son responsables del reconocimiento y la unión a los oligosacáridos presentes en la superficie celular de bacterias para ser fagocitadas por los macrófagos del huésped y de esta manera evadir el sistema de defensa(51).

La PIO es una fenazina que fácilmente puede penetrar las membranas biológicas. Este metabolito secundario, de color verde azulado, interfiere con la regulación de transporte de iones, la frecuencia de latido ciliar (mecanismo de defensa importante que elimina las partículas extrañas de las vías respiratorias) y la secreción de moco en las células epiteliales de las vías respiratorias al alterar la concentración citosólica de calcio (9, 41, 52). Esta fenazina posee actividad redox, es decir, tiene la capacidad de aceptar o donar electrones y con ello, es capaz de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de las células del huésped, provocando la acumulación de superóxido  $O_2^-$  y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), causando daño y muerte celular así como una respuesta inflamatoria (53). Este FV ha sido encontrado en muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística, heridas por quemaduras, incluso en muestras de orina (9, 53, 54). *P. aeruginosa* se protege de la actividad redox de su propia PIO activando la síntesis de genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo como alquil hidroperoxidasas reductasas (*ahps*, *ahpC*, *ahpF*, *ahpB*), tiorredoxina reductasa (*trxB2*) y la catalasa (*katB*)(55).

Actualmente se sabe que la PIO tiene un rol crucial en la virulencia de *P. aeruginosa* (13) y que su síntesis depende del sistema Rhl ya que mutantes *rhIR* no sintetizan PIO (37) y presentan una virulencia atenuada (13).

Los RL son moléculas anfipáticas con actividad tensoactiva que poseen una región hidrofóbica, conformada por un ácido graso, y por una región hidrofílica, constituida por una o dos unidades de azúcar ramnosa, llamados mono-RL y Di-RL, respectivamente.

Debido a la actividad tensoactiva de los RL, se ha reportado que pueden solubilizar a los fosfolípidos de los surfactantes pulmonares, inhibir el transporte mucociliar y alterar la superficie epitelial de células nasales volviéndola permeable y alterando su viabilidad (56). También se ha descrito que los RL tienen actividad hemolítica, lo que a su vez contribuye a la virulencia (57). Adicionalmente, se ha reportado que los RL son capaces de promover la infiltración de *P. aeruginosa* en células epiteliales del sistema respiratorio y con ello la invasión del tejido del huésped siendo su síntesis un mecanismo de colonización(56).

#### **1.4. Características del clado PA7 o grupo 3 de *P. aeruginosa*.**

En el año 2019, se realizó una reclasificación de *P. aeruginosa* utilizando 1,311 genomas, en ese estudio se propuso la existencia de cinco grupos filogenéticos (48). Las cepas de *P. aeruginosa* que pertenecen al clado PA7 (58) o grupo tres (48), presentan diferencias genómicas con respecto a la cepa de referencia PAO1. Carecen del gen *rhIC*, que codifica a la ramnosiltransferasa RhIC, la cual une la segunda unidad de ramnosa al mono-RL, por lo que las cepas que pertenecen al clado PA7 solo sintetizan RL de tipo mono-RL. También carecen de los genes *toxA* y *plcD*, que codifican para la exotoxina A y la fosfolipasa D, respectivamente (47, 59). Otra diferencia es que no poseen el sistema de secreción tipo III (T3SS), ya que carecen del grupo de 36 genes que codifican para las proteínas del T3SS; en la cepa de referencia PAO1 estos genes van desde *PA1690* al *PA1725*. Adicionalmente, el clado PA7, carece de los genes que codifican para algunos de los efectores del T3SS, *exoS*, *exoT*, *exoY* (47).

No obstante, se ha reportado que poseen el sistema *exlBA*, donde se secreta la exolisina ExlA (60). La expresión del operón *exlAB* es regulada de manera positiva por el regulador maestro Vfr (Virulence Factor Regulator) y por la concentración de AMP cíclico (cAMP) (60). Se reportó que la exolisina ExlA de la cepa *P. aeruginosa*

CLJ1, la cual pertenece al clado PA7 fue la causa de la neumonía hemorrágica presentada en un paciente infectado con esta cepa (61). Es importante recalcar que ExlA solo está presente en cepas que no tienen T3SS (61) y se desconoce el motivo por el cual no pueden coexistir ambos sistemas de virulencia en la misma cepa, o hasta el momento no se han reportado cepas que tengan ambos sistemas.

Otra característica de la cepa de referencia del clado PA7, es que su regulador transcripcional PqsR no es funcional, ya que tiene una deleción de dos nucleótidos en la posición 698 y 699 en la secuencia *pqsR* con respecto a la PAO1 (47). Esta deleción produce un cambio de marco de lectura de la proteína PqsR, generando una versión truncada de PqsR, que es incapaz de iniciar la síntesis del AI PQS desde el promotor del operón *pqsA-E*. Como se reportó en la cepa PA14, la mutación de PqsR tiene un efecto negativo sobre la expresión del operón *pqsA-E* y en consecuencia del gen *pqsE* (62).

Dentro de los genes que codifican para FV presentes en este clado, se encuentran los operones reiterados *phzA1* y *phzA2* encargados de la síntesis de PCA. Aunque carecen del gen *phzH*, encargado de sintetizar la fenazina-1-carboxilamida (Fig.2), son capaces de sintetizar PIO, ya que para su síntesis solo se requiere la participación de los operones *phzA1*, *phzA2*, y de los genes *phzM* y *phzS* (41). También cuentan con el gen *lasB* y el operón *rhlAB*, que sintetizan la proteasa ELA y los mono-RL, respectivamente (47).

En esta tesis se trabajó con la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027 que pertenece al clado PA7 o grupo 3 de *P. aeruginosa*, cuyos antecedentes se presentan a continuación.

## 2. Antecedentes.

La cepa ATCC 9027 fue aislada de un caso de otitis externa en el año 1943. Posteriormente fue secuenciada y se confirmó que pertenece al grupo 3 de *P. aeruginosa* (59, 63), este aislado al igual que la cepa PA7, es mutante del gen *rhIC* y carece del sistema de secreción tipo III (T3SS). Es capaz de sintetizar FV dependientes del sistema de DQ, como PIO y mono-RL (59, 64).

Se reportó que el mono-RL sintetizado por esta cepa mejoró la solubilidad, disponibilidad y biodegradación del hidrocarburo octadecano, por lo que este metabolito secundario tiene importancia biotecnológica (65).

Adicionalmente, se reportó en el modelo de infección intraperitoneal en ratón, que esta cepa no es virulenta; a pesar de que es capaz de sintetizar FV, como la exolisina ExlA (59, 60).

Si bien, previamente se reportó la síntesis de PIO y mono-RL de la cepa ATCC 9027 cultivada en medio PPGAS (65), en experimentos previos realizados en el laboratorio se observó la ausencia de estos FV cuando la cepa fue cultivada en medio rico LB.

La producción de PIO y mono-RL por esta cepa, sugiere que cuenta con un sistema Rhl funcional ya que estos fenotipos se regulan directamente por este sistema. Adicionalmente, experimentos previos sugieren que el sistema Rhl de esta cepa se expresa únicamente cuando es cultivado en medio PPGAS y no cuando es cultivado en medio LB, es importante mencionar que la síntesis de PIO observada ocurre pese a que la cepa ATCC 9027 es mutante *pqsR* (59). En cambio, la falta de producción de ELA en la cepa sugiere que tiene un sistema Las no funcional a pesar de contar con los genes *lasR* y *lasI*.

Se han reportado aislados clínicos de mutantes del sistema Las, capaces de sintetizar PIO (44, 45) pero incapaces de sintetizar ELA (34, 45, 66). Groleau et al. 2020, reportó que la síntesis de PIO de una mutante PA14 $\Delta$ *lasR* depende de expresión del sistema Rhl y de la presencia de la proteína PqsE (42), aunque la

cepa ATCC 9027 es mutante PqsR y se espera que esa mutación impida la expresión de *pqsE*.

¿Es posible que, además de la mutación en *pqsR*, la cepa ATCC 9027 sea una mutante *lasR*?

Actualmente se sabe que la cepa ATCC 9027 tiene un sistema de DQ atípico con respecto a la cepa de referencia PAO1. Esta cepa es mutante *pqsR*, por lo que no sintetiza el AI PQS y por lo tanto tiene un sistema Pqs no funcional (59). El fenotipo de una mutante *pqsR* en la cepa de referencia PAO1 es la falta de producción de PIO en medio LB (21, 31, 67). PqsR enciende la expresión del operón *pqsA-E* en donde se encuentra codificada la proteína PqsE, que se ha reportado tener un papel fundamental en la regulación de la síntesis de PIO en la cepa de referencia. ¿Es la falta de expresión de *pqsE* por la mutación en *pqsR* el motivo por el cual la cepa ATCC 9027 no sintetiza PIO y Mono-RL en medio LB? ¿Qué mecanismo está actuando en la cepa cuando es cultivada en medio PPGAS que permite la síntesis de PIO y Mono-RL?

Estas son algunas preguntas que surgen de estudios previamente realizados en la cepa ATCC 9027, y las cuales nos permitieron formularnos el presente proyecto.

### **3. Justificación.**

Como se mencionó en los antecedentes, la síntesis de FV que dependen del sistema de DQ en *P. aeruginosa*, requiere que el sistema Las active la transcripción del sistema Rhl y que el regulador transcripcional PqsR active la transcripción del gen *pqsE* desde el promotor de *pqsA*. La falta de producción de ELA en medio LB de la cepa ATCC 9027 sugiere que es mutante LasR, en cambio la síntesis de PIO y Mono-RL observada cuando la cepa es cultivada en medio PPGAS, sugiere que el sistema Rhl puede ser expresado de manera independiente al sistema Las y de que *pqsE* se puede expresar de manera independiente de PqsR.

Los fenotipos observados en la cepa ATCC 9027 indican que posee un sistema de DQ atípico con respecto a la cepa de referencia PAO1. Estas observaciones plantean preguntas de investigación interesantes sobre cómo se regula la síntesis

de factores de virulencia en cepas pertenecientes al clado PA7, hasta ahora poco estudiadas.

#### **4. Hipótesis.**

La falta de síntesis de elastasa, piocianina y ramnolípidos en la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027 cultivada en medio LB se debe a que tiene mutaciones en los reguladores transcripcionales LasR y PqsR, bajo esta condición de cultivo la síntesis de estos factores de virulencia depende del sistema Las y Pqs, mientras que en medio PPGAS la síntesis de estos metabolitos secundarios se vuelve independiente de LasR y PqsR.

#### **5. Objetivos.**

##### **5.1. General.**

- Determinar el efecto de la falta de las mutaciones en los reguladores transcripcionales LasR y PqsR en la síntesis de elastasa, piocianina y ramnolípidos de la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027 cultivada en medio LB y en medio PPGAS.

##### **5.2. Específicos.**

- Demostrar que la falta de síntesis de elastasa y ramnolípidos en la cepa ATCC 9027 cultivada en medio LB se debe a las mutaciones de la proteína LasR y PqsR.
- Demostrar que la síntesis de piocianina y ramnolípidos observado en medio PPGAS se debe a que *pqsE* se expresa de manera independiente al regulador transcripcional PqsR.
- Estudiar el papel de la proteína PqsE en la síntesis de factores de virulencia que dependen del sistema Rhl.

## 6. Materiales y métodos.

Esta sección se divide en dos, primero se presentarán los materiales y métodos utilizados en el estudio de la mutación del regulador LasR en la cepa ATCC 9027, posteriormente, se presentan los correspondientes al estudio de la mutación de PqsR.

### 6.1. Material biológico y medios de cultivo.

Las cepas y plásmidos utilizados en el estudio de la mutación LasR y PqsR de la cepa ATCC 9027 se incluyen en las tablas 1 y 3 (anexo 9) respectivamente.

Los plásmidos de las tablas 1 y 3, fueron construidos utilizando los oligonucleótidos listados en las tablas 2 y 4 (anexo 9), respectivamente. Los sitios de restricción fueron agregados en el extremo 5' de los oligonucleótidos para facilitar la clonación de los productos de PCR.

Los antibióticos utilizados para seleccionar los plásmidos utilizados se describen a continuación: *E. coli* DH5 $\alpha$ , 30  $\mu$ g/mL gentamicina (Gm<sup>R</sup>), 200 $\mu$ g/mL carbenicilina (Cb<sup>R</sup>), 15 $\mu$ g/mL tetraciclina (Tet<sup>R</sup>), 50 $\mu$ g/mL estreptomycin (Sm<sup>R</sup>) y 100 $\mu$ g/mL ampicilina (Ap<sup>R</sup>), 100 $\mu$ g/mL carbenicilina (Cb<sup>R</sup>). Para *P. aeruginosa*, 100  $\mu$ g/mL Gm<sup>R</sup>, 120  $\mu$ g/mL Tet<sup>R</sup>, 100  $\mu$ g/mL Sm<sup>R</sup>, 200  $\mu$ g/mL Ap<sup>R</sup>, 200 $\mu$ g/mL Cb<sup>R</sup>

Todos los plásmidos utilizados fueron replicados en *E. coli* DH5 $\alpha$  e introducidos por electroporación (68) en las diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

Los experimentos para estudiar la mutación de LasR fueron realizados en medio de cultivo LB y para el estudio de la mutación de PqsR se realizaron en medios de cultivo LB y PPGAS (NH<sub>4</sub>Cl (0.02M), KCl (0.02M), Tris-HCl (0.12M), Glucosa (0.5%), proteosa-peptona (1%) y MgSO<sub>4</sub> (0.0016M) pH 7.4 (59). Un medio bajo en fosfatos para *P. aeruginosa* se considera a partir de tener 0.2 mM de fosfato de potasio (69, 70), la fuente de fosfato del medio PPGAS la proporciona el buffer de fosfatos utilizado en la elaboración de la proteosa-peptona por parte del fabricante (71), por lo que se desconoce la concentración exacta de fosfato del medio. Para ambos estudios, las cepas se cultivaron a 37 °C con agitación orbital (225 rpm).

## **6.2. Métodos utilizados para estudiar la mutación del regulador transcripcional LasR en la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027.**

### **6.2.1. Construcción de los plásmidos para sobreexpresar LasR, y cuantificar los promotores *lasB* y *rhIR*.**

Las versiones de LasR de las cepas PAO1 (P-LasR), ATCC 9027 (A-LasR) y PA7 (P7-LasR) fueron clonadas como se describe a continuación.

Los plásmidos pUCP24-PlasR (P-LasR), pUCP24-AlasR (A-LasR) y pUCP24-P7lasR (P7-LasR), fueron construidos amplificando el gen *lasR* del ADN genómico de las cepas PAO1, ATCC 9027 y PA7, utilizando los oligonucleótidos LasRFWBamHI y LasRRVHindIII.

Posteriormente, los productos de PCR fueron clonados en el plásmido pJET 1.2 blunt, para generar las siguientes construcciones: pJET1.2-P-LasR, pJET1.2-A-LasR y pJET1.2-P7-LasR. Las construcciones antes mencionadas fueron digeridas con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, los fragmentos de 742 pb obtenidos fueron clonados en el plásmido pUCP24 en los mismos sitios de restricción. Los plásmidos fueron secuenciados para confirmar la ausencia de mutaciones.

Las fusiones transcripcionales pMP220-plasB-P y pMP220-plasB-A fueron construidas amplificando el promotor *lasB* del ADN genómico de las cepas PAO1 y ATCC 9027, con los oligonucleótidos PLasBFWBgIII y PLasBFWPstI.

Los productos de PCR fueron clonados en el vector pJET 1.2 blunt para formar los plásmidos pJET1.2-plasB-P y pJET1.2-plasB-A, mismos que fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bg*II y *Pst*I. Los fragmentos de 269 pb obtenidos fueron clonados en el plásmido pMP220.

Los plásmidos pSEVA-PrhIR-P y pSEVA-PrhIR-A fueron utilizados para cuantificar la expresión de *rhIR* de las cepas PAO1 y ATCC 9027 respectivamente. Para construirlos, se amplificó el promotor de *rhIR* incluyendo su secuencia Shine-Dalgarno y nueve tripletes de la secuencia estructural de *rhIR*. El PCR se realizó con los oligonucleótidos PrhIRFWEcoRI y PrhIRRVBamHI y utilizando como molde el ADN genómico de las cepas PAO1 y ATCC 9027. Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas *Eco*RI y *Bam*HI, y clonados en el vector pUJ9 para obtener los plásmidos pUJRhIR-P y pUJRhIR-A. Posteriormente, fueron digeridos

con la enzima *NotI* para obtener los fragmentos *rhIR'-lacZ* los cuales fueron clonados en el vector pSEVA421 en el mismo sitio de restricción, formando las fusiones traduccionales (72) pSEVA-PrhIR-P and pSEVA-PrhIR-A.

## **6.2.2. Cuantificación de los factores de virulencia.**

### **6.2.2.1. Cuantificación de la actividad elastolítica de la elastasa LasB.**

La actividad elastolítica de ELA LasB se determinó utilizando el reactivo elastina-Congo Red (Sigma Aldrich) (73) con algunas modificaciones. Se realizó un pre-cultivo en medio LB con antibiótico durante 16h. Los pre-cultivos se utilizaron para inocular matraces con 30 mL de medio LB sin antibióticos a una  $DO_{600nm}$  inicial de 0.05. Los matraces fueron incubados durante 16 h con agitación (225 rpm).

Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados (14,000 x g durante 5 minutos) y 100  $\mu$ L de cada sobrenadante fue agregado a tubos Eppendorf de 2 mL, que contenían 5 mg del reactivo elastina-congo Red y 900  $\mu$ L de buffer de reacción (0.1 M Tris-HCl pH 7.2, 1 mM  $CaCl_2$ ). Los tubos fueron incubados a 37°C por 30 min con agitación (225 rpm). Cuando finalizó la reacción, los tubos fueron centrifugados a 14,000 x g por 10 minutos y la absorbancia del sobrenadante fue medido por espectrofotometría a una D.O. de 495 nm.

Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras.

### **6.2.2.2. Detección de la producción de ramnolípidos mediante cromatografía de capa fina.**

Los RL fueron determinados por cromatografía de capa fina (TLC) de acuerdo a la técnica reportada por Matsuyama et al. 1987 (74). Se realizaron pre-cultivos de las cepas durante 16 h a 37°C, con agitación y en medio LB con antibióticos. Posteriormente, los pre-cultivos fueron utilizados para inocular matraces con 30 mL de medio LB sin antibióticos a una  $D.O_{600nm}$  de 0.05, los cuales fueron cultivados durante 16 h a 37°C, con agitación 225 rpm. Los sobrenadantes fueron obtenidos por centrifugación 14,000 x g por 10 minutos a 4°C. Se colocó 5 mL de cada sobrenadante en tubos Falcon de 50 mL, a continuación, se agregó a cada tubo, 20

$\mu\text{L}$  de HCl y 5 mL de la mezcla 2:1 de cloroformo y metanol; una vez realizado esto, los tubos fueron agitados durante 15 minutos. Después de centrifugar los tubos, se recuperó la fase orgánica de cada tubo y se dejó evaporar a temperatura ambiente en una campana de extracción. 100  $\mu\text{L}$  de metanol fue agregado a los tubos secos y 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra fue cargado en las placas de TLC (TLC SILICA GEL 60 F254 MERK). La TLC fue desarrollada utilizando la siguiente fase móvil: cloroformo-metanol-ácido acético 65:15:2, finalmente la placa fue rociada con una solución de  $\alpha$ -naftol y calentada en la estufa a 80°C. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

### **6.2.3. Detección de la proteína LasR por Western blot.**

La detección de la proteína LasR se realizó por Western blot utilizando anticuerpos anti LasR de acuerdo con Grosso-Becerra *et al.* (2014). Las cepas fueron cultivadas en medio LB durante 16 h a 37°C con agitación. Posteriormente, cada cultivo fue centrifugado. La biomasa recuperada se suspendió en buffer PA (10 mM buffer de fosfato de sodio, 30 mM NaCl, 0.25% Tween-20, 10 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 7.5) y 10  $\mu\text{L}$  de lisozima (10 mg mL<sup>-1</sup>) se agregó a cada muestra e incubada durante 20 min a 37°C.

Una vez terminado el tiempo de incubación, las células fueron incubadas en hielo y a cada muestra se le adicionó 50  $\mu\text{L}$  de inhibidor de proteasas 14x (Complete™ Sigma) para proceder a romper las células por sonicación.

Después de la lisis por sonicación, las muestras fueron centrifugadas (14,000 x g durante 10 min a 4°C) y los sobrenadantes (que contenían la fracción soluble de la proteína de interés) se mezclaron 1:1 v/v con el buffer de carga Laemmli.

La concentración de proteínas de cada muestra fue determinada por el método Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina de suero bovino como estándar.

13  $\mu\text{g}$  de proteína fueron separados en un gel para electroforesis SDS-PAGE (0.1% SDS, 12% poliacrilamida) y transferidos a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences). Se bloqueó la membrana durante 16 h con una solución al 10% de leche desnatada (Difco™) y 1:1,000 del anticuerpo anti-LasR. El anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG-HRP se utilizó a una dilución

1:10,000. La detección de luminiscencia se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia (Thermi Fisher) seguido por la exposición de la membrana a una película de radiografía (Amersham Biosciences). El Western blot fue realizado por duplicado.

#### **6.2.4. Cuantificación de la expresión de los promotores *lasB* y *rhIR*.**

Las cepas que contienen las fusiones del promotor *lasB* de PAO1 o ATCC 9027 en los plásmidos pMP220-PlasB-P y pMP220-PlasB-A, respectivamente, fueron cultivadas durante 16 horas en medio LB con antibióticos. Estos precultivos se utilizaron para inocular 15 mL de medio LB sin antibióticos a una D.O<sub>600nm</sub> de 0.05 y cultivados a 37°C con agitación (225 rpm) durante 16 horas. 100 µL de cada cultivo fueron utilizadas para realizar la cuantificación de la actividad β-galactosidasa de acuerdo con lo descrito por Miller 1992 (75). La cuantificación de las fusiones traduccionales del promotor *rhIR* (Promotor que depende de LasR) de PAO1 y ATCC 9027 clonados en los plásmidos pSEVA-PrhIR-P y pSEVA-PrhIRA se realizó la metodología arriba explicada.

### **6.3. Métodos utilizados para estudiar la mutación del regulador transcripcional PqsR en la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027.**

#### **6.3.1. Construcción de los plásmidos para sobreexpresar *pqsR* y *pqsE*.**

El plásmido pUCP24-*pqsR* fue construido amplificando la secuencia de *pqsR* del ADN genómico de PAO1 con los oligonucleótidos pqsRFW y pqsRRV, el producto de PCR fue clonado en el plásmido pJET 1.2 blunt, posteriormente el plásmido fue digerido con *EcoRI* y *SmaI*, el fragmento de 1 kb fue clonado en el plásmido pUCP24 en los mismos sitios de restricción.

El plásmido pUCP24-*pqsE* fue construido amplificando el gen *pqsE* de la cepa PAO1 con los oligonucleótidos pqsEFW y pqsERV. El fragmento de PCR fue clonado en el pJET 1.2 blunt. Posteriormente, el plásmido fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*, el fragmento de 1 kb obtenido se clonó en el plásmido pUCP24 digerido previamente con las mismas enzimas de restricción.

### 6.3.2. Construcción de las mutantes *pqsR* y *pqsE* de la cepa PAO1.

Las mutantes *pqsR* y *pqsE* en el fondo genético de la cepa PAO1 fueron generadas por doble recombinación homóloga de plásmidos que acarreaban versiones mutantes por inserción-delección del gen a mutar (76) clonados en el plásmido suicida pEX18-Sm.

El plásmido pEX18-Sm fue construido de la siguiente manera: Un fragmento de 1403 pb correspondiente al casete de estreptomicina fue amplificado del plásmido pIJ778 (77), digerido con *Pst*I y rellenado con la enzima Klenow (NEB). Después, este casete fue ligado en el plásmido pEX18-Gm (78), previamente digerido con *Bgl*II y rellenado con la enzima Klenow (NEB).

Se construyeron los plásmidos pEX-*pqsR*::Apra y pEX-*pqsE*::Gm para mutar *pqsR* y *pqsE* respectivamente. El plásmido pEX-*pqsR*::Apra fue construido de la siguiente manera: Dos fragmentos de ADN fueron amplificados utilizando como templado ADN de la cepa PAO1, el primero contenía la región 5'-UTR y una porción de la región codificante de *pqsR* (584 pb) y se amplificó con los oligonucleótidos *pqsR* up/*pqsR* 5Aa. El segundo fragmento contenía la región 3'-UTR y una porción de la región codificante de *pqsR* (472 pb) y se amplificó con los oligonucleótidos *pqsR* 3Aa/*pqsR* down.

Los fragmentos antes mencionados se empalmaron con el producto de PCR obtenido de amplificar el casete de resistencia a apramicina (1370 pb) (amplificado por PCR a partir del plásmido pIJ778 con los oligonucleótidos F-Apra y R-Apra) por PCR con los oligonucleótidos attB1-Hd3/attB2-Hd3. El fragmento de ADN resultante (2.4kb) fue clonado en los sitios *Hind*III del plásmido pEX18-Sm.

El plásmido pEX-*pqsE*::Gm fue construido amplificando por PCR la región 5'-UTR y una porción de la región codificante de *pqsE* (446 pb) y la región 3'-UTR y una porción de la región codificante de *pqsE* (570 pb) con los oligonucleótidos *pqsE* up/*pqsE* 5Aa y *pqsE* 3Aa/*pqsE* down respectivamente.

Ambos fragmentos se empalmaron con el producto de PCR obtenido de amplificar el casete de resistencia a gentamicina (935 pb) (amplificado por PCR a partir del

plásmido pUCP24 con los oligonucleótidos F-Gm y R-Gm) por PCR con los oligonucleótidos *pqsE* up/*pqsE* down. El fragmento de ADN resultante (1.9 kb) fue clonado en los sitios *HindIII* del plásmido pEX18-Sm.

### **6.3.3. Construcción de la mutante *pqsE* de la cepa ATCC 9027.**

La construcción de la cepa ATCC 9027 $\Delta$ *pqsE* se construyó interrumpiendo el gen *pqsE* con el gen de resistencia a gentamicina. Primero se amplificaron 445 pb de la región 5'-UTR y 570 de la región 3'-UTR de *pqsE* utilizando los oligonucleótidos *pqsE* up/*pqsE* down. El producto de PCR fue clonado en el plásmido pJET 1.2 blunt para formar el plásmido pJET-ATE, que fue digerido con la enzima de restricción *KpnI* (la secuencia de *pqsE* de la cepa ATCC 9027, tiene un sitio interno de *KpnI* en el nucleótido 66) y rellenado para generar sitios romos.

Posteriormente, se clonó el casete de resistencia a gentamicina en los sitios romos generados en el pJET-ATE para formar el plásmido pJET-ATEGM. Este último plásmido fue digerido con *HindIII* y el fragmento de 2.7 kb fue ligado en el pEX18-Sm en los mismos sitios de restricción para formar el pEX18AT-*pqsE*:: $\Omega$ Gm. Se cultivo a la cepa ATCC 9027 durante 16 horas a 42°C y se transformó con el plásmido pEX18AT-*pqsE*:: $\Omega$ Gm utilizando el método de electroporación (68).

### **6.3.4. Detección de la producción de las quinolonas PQS/HHQ utilizando un biosensor.**

Las cepas para analizarse fueron cultivadas en medio LB durante 8 horas, los sobrenadantes fueron recuperados por centrifugación y posteriormente filtrados (Filtro Corning 0.2 $\mu$ m). El biosensor PAO1 $\Delta$ *pqsA*-miniCTX::*PpqsA luxCDABE* fue cultivado por 16h en medio LB, después 1 mL del cultivo se estandarizó a una D.O<sub>600nm</sub> de 1, para continuar realizando una dilución 1/50 con medio LB fresco. El biosensor y los sobrenadantes fueron agregados en matraces de 125 mL en una relación 1:1 y cultivados durante 8 horas a 37°C con agitación (225 rpm). Posteriormente, 200 $\mu$ L de cada matraz fue colocado en platos de 96 pozos y se cuantificó la luminiscencia y el crecimiento. La luminiscencia se reportó como unidades relativas de luz (RLU) dividido entre D.O. Medio LB fue utilizado como control negativo. Estos ensayos se realizaron por triplicado.

### **6.3.5. Cuantificación de la producción de piocianina y ramnolípidos.**

La cuantificación de PIO se realizó como se ha reportado (79). Se realizó un pre-cultivo durante 16 horas en medio LB con las cepas objeto de estudio. Se inocularon matraces de 125 mL con 30 mL de medio LB o PPGAS y se cultivaron durante 16 y 24 horas, respectivamente, con agitación (225 rpm) a 37°C. 5 mL de cada sobrenadante de LB o PPGAS fueron extraídos con cloroformo, posteriormente, se realizó una reextracción adicionando a cada muestra, 1 mL de ácido clorhídrico 0.2 N. Se cuantificó la absorbancia de esta solución por espectrofotometría a 520 nm. La concentración de PIO se expresó como microgramos de PIO producidos por mL de sobrenadante, multiplicando la absorbancia por el factor 17.072.

Para el análisis cuantitativo de la producción de RL por el método de orcinol (que mide la ramnosa presente en las muestras), se tomaron 333  $\mu$ L de cada sobrenadante obtenido de cultivar las cepas 24 horas en medio PPGAS y se les agrega 1 mL de dietiléter. La mezcla se agita y centrifuga a 14,000 rpm por 2 minutos. Se recolecta la fase superior. Esta extracción se repite dos veces. Los 2 mL obtenidos se dejan evaporar. Una vez seca, la muestra se disuelve en 1 mL de agua bidestilada. De cada disolución se toman 100  $\mu$ L y se les agregan 900  $\mu$ L de una mezcla de orcinol-ácido sulfúrico. Las muestras se calientan a 80°C en un baño maría por 30 minutos y luego se dejan enfriar a temperatura ambiente por 15 minutos. En seguida se miden en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 421 nm. El contenido de ramnosa se determina comparando los valores obtenidos de cada muestra con una curva de calibración con estándares de ramnosa.

### **6.3.6. Determinación de la expresión de *pqsE* por transcripción reversa acoplada a PCR (RT-PCR).**

Para determinar la presencia del transcrito de *pqsE*, se cultivó a las cepas durante 16 horas en medio LB con antibióticos. Posteriormente se inocularon matraces de 125 mL con 30 mL de medio LB o PPGAS a una D.O<sub>600 nm</sub> de 0.05 y se cultivaron durante 12 horas con agitación (225 rpm) a 37°C. Luego, los cultivos se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 minutos en frío y se extrajo el ARN total utilizando el reactivo de Invitrogen™ TRIzol de acuerdo con las instrucciones del producto.

A continuación, 3µg de ARN total fueron digeridos con DNase I, RNase-free (Thermo SCIENTIFIC). La síntesis de cDNA se desarrolló utilizando el kit ReverAID H Minus First Strands cDNA Synthesis (Thermo SCIENTIFIC) con 0.5 µg de ARN libre de ADN y 2 picogramos del oligonucleótido reverso RTpqsEATRV para sintetizar cDNA de la ATCC 9027, RTpqsEPARV para sintetizar cDNA de la cepa PAO1 y RTtpsLRV para sintetizar cDNA de ambas cepas.

Los cDNAs generados fueron utilizados como templados para reacciones de PCR como se indica a continuación: PCR de *pqsE* de la cepa ATCC 9027 se utilizaron los oligonucleótidos RTpqsEATFW/RTpqsEATRV, para la cepa PAO1 se utilizaron los oligonucleótidos RTpqsEPAFW/RTpqsEPARV, y los oligonucleótidos RTtpsLFW/RTtpsLRV se utilizaron para ambas cepas. ADN genómico de cada cepa fue utilizado como control positivo y muestras sin transcriptasa reversa fueron utilizados como controles negativos.

#### **6.3.6.1 Ensayo preliminar para la detección de la presencia de un autoinductor sintetizado por PqsE.**

De manera preliminar, para estudiar si el papel de PqsE era sintetizar un autoinductor que se une a RhIR como previamente lo reportó Mukherjee et al. 2018 (80). Se realizaron ensayos utilizando extractos obtenidos con acetato de etilo acidificado de acuerdo con la metodología utilizada por Grosso-Becerra et al 2014b (81). Se realizó un pre-cultivo de las cepas PAO1, PAO1Δ*pqsE*, PAO1Δ*pqsE*/pUCP20-*pqsE*. en medio LB y se cultivaron a 37°C, durante 16 horas y con agitación (225rpm). Se inocularon matraces de 125 mL con 30 mL de medio LB a una D.O<sub>600nm</sub> inicial de 0.05, se cultivaron durante 16 horas a 37°C con agitación. Posteriormente cada cultivo se centrifugó a 14,000 rpm por 12 minutos a 4°C y colectó el sobrenadante en un tubo Falcon limpio. Se filtraron los sobrenadantes para eliminar las células bacterianas, y se colocaron 5 mL de cada sobrenadante filtrado en tubos Falcon de 15 mL (polipropileno) con 5 mL de acetato de etilo acidificado (100 mL de acetato de etilo + 10 ul de ácido acético), se agitó vigorosamente por 15 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 3500 rpm a 4°C. Con una pipeta se sacó la fase superior, y se colocó en un tubo nuevo para dejar el

solvente en la campana de extracción (La extracción se realizó dos veces). Los extractos ya secos, se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL, y se disolvieron con 50 µL de metanol. Para el ensayo, se adicionó 15 µL de cada extracto por separado a un cultivo de PAO1Δ*rhII* que es incapaz de sintetizar PIO y se dejó cultivar por 16 horas en medio LB a 37°C con agitación. Pasado este tiempo se observó la síntesis de PIO en los sobrenadantes.

Para el segundo ensayo de detección, se realizaron co-cultivos, utilizando como biosensor a la cepa PAO1Δ*pqsE*/pMP220-*PphzA1::lacZ*. Este biosensor fue co-cultivado con las cepas PAO1, PAO1Δ*pqsE*, PAO1Δ*pqsE*/pUCP20-*pqsE*, PAO1Δ*rhII*, PAO1Δ*rhII*/pUCP20-*pqsE*. Como biosensor control se utilizó a la cepa PAO1/pMP220-*PphzA1::lacZ*.

#### **6.3.7. Detección de la proteína RhIR por Western blot.**

La detección de RhIR se realizó de acuerdo con Grosso-Becerra et al. 2014 (81). El análisis por Western blot fue desarrollado con extractos crudos de las cepas cultivadas por 24 horas en medio PPGAS, las células fueron recuperadas por centrifugación y resuspendidas en buffer PA (10 mM de buffer de fosfato de sodio, 30 mM NaCl, 0.25% Tween-20, 10 mM EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol, pH 7.5), 10 µL de lisozima (10 mg/mL) fue agregado a cada muestra e incubado por 20 minutos a 37°C. Después de la incubación, las células fueron puestas en hielo y se adicionaron con inhibidor de proteasas 14x (Complete™, Sigma Aldrich), posteriormente, las células fueron lisadas por sonicación.

Los restos celulares después de la sonicación fueron removidos por centrifugación (14,000 x por 10 min a 4°C) y los sobrenadantes (que contienen la proteína de interés) fueron mezclados 1:1 con buffer de carga Laemmli. La concentración de la proteína total de cada muestra fue cuantificada mediante el kit Bio-Rad utilizando albumina de suero bovino como estándar. Cantidades iguales de proteínas (13µg) fueron separadas por electroforesis en gel 12% dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) y los geles fueron electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa Hybond-C Extra (Amersham Biosciences). Para la detección de RhIR, la membrana fue bloqueada con 10% de leche desnatada (Difco™) durante toda la

noche e incubada con 1:1000 de anticuerpo anti RhIR de conejo. El anticuerpo secundario de cabra anti-conejo IgG-HRP se utilizó a una dilución 1:10 000. La detección de luminiscencia se realizó mediante el kit de quimioluminiscencia (Thermo Fisher) seguido por la exposición de la membrana a una película de radiografía (Amersham Biosciences).

### **6.3.8. Cuantificación de la expresión de los promotores de *rhIR*.**

La cepa PW6882, tiene insertado en el cromosoma un transposón que interrumpe con el gen *lacZ* a la secuencia de *rhIR* y la expresión de *lacZ* se encuentra en fase y se transcribe a partir de los promotores de *rhIR*. Se transformó a la cepa PW6882 con los plásmidos, pGMYC, pGMYC-*pqsE* y pUCP20-*pqsE*. Para cuantificar la actividad  $\beta$ -galactosidasa se realizaron precultivos durante 16 horas en medio LB con antibióticos. Mismos que se utilizaron para inocular 15 mL de medio LB sin antibióticos a una D.O<sub>600nm</sub> de 0.05 y cultivados a 37°C con agitación (225 rpm) durante 16 horas. 100  $\mu$ L de cada cultivo fueron utilizadas para realizar la cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de acuerdo con lo descrito por Miller 1992 (75).

## **7. Resultados y discusión.**

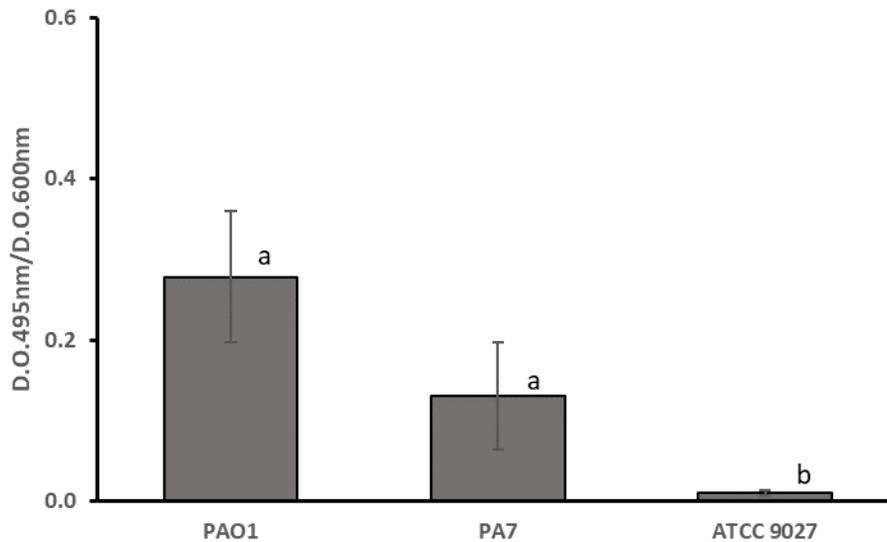
Esta sección se divide en dos capítulos, en el primer capítulo se incluyen los resultados y discusión del estudio de la mutación de *lasR* en la cepa ATCC 9027 y en el segundo capítulo se incluye lo referente al estudio de la mutación de *pqsR* en la cepa de estudio.

### **7.1. Resultados y discusión del estudio de la mutación de LasR de la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027.**

#### **7.1.1. Análisis de la secuencia de aminoácidos del sistema Las de la cepa ATCC 9027.**

La cepa ATCC 9027 cultivada en medio LB fue incapaz de sintetizar ELA en medio LB (Fig. 3). La síntesis de este FV depende del sistema Las (4), los resultados que se observan en la figura 3, sugieren que la cepa ATCC 9027 tiene un sistema Las

deficiente. Las cepas PAO1 y PA7 que sintetizaron ELA fueron utilizadas como referencia en estos experimentos.



**Figura. 3. Cuantificación de la actividad elastolítica en medio LB.** Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras.

Para determinar si existen mutaciones en las proteínas que conforman al sistema Las de la cepa de estudio y que éstas pudieran explicar el fenotipo de ausencia de ELA, se realizó un alineamiento global utilizando las secuencias de aminoácidos del regulador transcripcional LasR y de la sintasa LasI (Figura 4 y 5). Las secuencias de ambas proteínas se compararon con las secuencias de las cepas PAO1 y PA7.

```

PAO1_LasI      MIVQIGRREEFDKKLLGEMHKLRAQVFKERKGDVSVIDEMEIDGYDALSPYYMLIQEDT 60
PA7_LasI      MIVQIGRREEFDKKLLGEMHKLRAQVFKERKGDVSVIDEMEIDGYDALSPYYMLIQEDT 60
ATCC9027_LasI MIVQIGRREEFDKKLLGEMHKLRAQVFKERKGDVSVIDEMEIDGYDALSPYYMLIQEDT 60
*****

PAO1_LasI      PEAQVFGCWRILDTTGPYMLKNTFPELLHGKEAPCSPHIWELSRFAINSGQKGS LGFSDC 120
PA7_LasI      PEAQVFGCWRILDTTGPYMLKNTFPELLHGKEAPCSPHIWELSRFAINSGQKGS LGFSDC 120
ATCC9027_LasI PEAQVFGCWRILDTTGPYMLKNTFPELLHGKEAPCSPHIWELSRFAINSGQKGS LGFSDC 120
*****

PAO1_LasI      TLEAMRALARYSLQNDIQTLVTVTTVGVKEMMIRAGLDVSRFGPHLKIGIERAVALRIEL 180
PA7_LasI      TLEAMRALARYSLQNDIQTLVTVTTVGVKEMMIRAGLDVSRFGPHLKIGIERAVALRIEL 180
ATCC9027_LasI TLEAMRALARYSLQNDIQTLVTVTTVGVKEMMIRAGLDVSRFGPHLKIGIERAVALRIEL 180
*****

PAO1_LasI      NAKTQIALYGGV LVEQRLAVS 201
PA7_LasI      NAKTQIALYGGV LVEQQAVS 201
ATCC9027_LasI NAKTQIALYGGV LVEQQAVS 201
*****:****

```

**Figura. 4. Alineamiento global de la secuencia de aminoácidos de la proteína LasI.** Realizado con la herramienta Clustal omega de EMBOSS. El cambio R197Q está resaltado en color negro.

Como se observa en la figura 4, la cepa ATCC 9027 tiene la misma secuencia de aminoácidos de LasI que la cepa PA7, y esta última es capaz de sintetizar ELA (Fig.4). Con respecto a la secuencia de la cepa PAO1, hay un cambio equivalente R197Q, la cepa PAO1 tiene una arginina (R) y la ATCC 9027 así como la cepa PA7 tienen glutamina (Q). Arginina y glutamina se clasifican dentro de los aminoácidos polares, arginina es un aminoácido con carga positiva, mientras que glutamina se clasifica como un aminoácido sin carga. La síntesis de ELA observado en la cepa PA7 (Fig.3) indica que posee un sistema Las funcional, como la cepa ATCC 9027 tiene la misma secuencia LasI que la cepa PA7 se espera que posea una proteína LasI funcional.

La proteína LasR de la cepa ATCC 9027 (A-LasR) tiene cinco cambios de aminoácidos con respecto a la secuencia de la cepa PAO1 (P-LasR), R66K (cambio conservativo), N136S, A138V, S172N y E197D. Con respecto a la cepa PA7 (P7-LasR) tiene dos cambios, A138V y E197D, este último corresponde a un cambio conservativo (Figura 5).

```

PA01_LasR      MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
PA7_LasR      MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
ATCC9027_LasR MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
*****

PA01_LasR      REHYDRAGYARVDPTVSHCTQSVLPFIWFEPsiYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
PA7_LasR      REHYDKAGYARVDPTVSHCTQSVLPFIWFEPsiYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
ATCC9027_LasR REHYDKAGYARVDPTVSHCTQSVLPFIWFEPsiYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
*****

PA01_LasR      ARGELGALSLSVEAENRAEANRFMESVLP TLWMLKDYALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT SR 180
PA7_LasR      ARGELGALSLSVEAESRAEANRFMESVLP TLWMLKDYALQSGAGLAFEHPVNKPVVLT SR 180
ATCC9027_LasR ARGELGALSLSVEAESRVEANRFMESVLP TLWMLKDYALQSGAGLAFEHPVNKPVVLT SR 180
*****

PA01_LasR      EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI RRKFGVTSRRVAAIMAVNLGLITL 239
PA7_LasR      EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI RRKFGVTSRRVAAIMAVNLGLITL 239
ATCC9027_LasR EKEVLQWCAIGKTSWDISVICNCSEANVNFHMGNI RRKFGVTSRRVAAIMAVNLGLITL 239
*****

```

**Figura. 5. Alineamiento global de la secuencia de aminoácidos de LasR.** Realizado con la herramienta Clustal omega de EMBOSS. Los cambios R66K, N136S y S172N están resaltados en color negro. Los cambios A138V y E197D están resaltados en color rojo.

La actividad elastolítica de la ELA de la cepa PA7 (Fig. 3), indica que tiene una proteína LasR funcional. Los dos cambios de aminoácidos en la secuencia A-LasR (ATCC 9027) con respecto a la P7-LasR (PA7) (Fig.5), podrían ser los causantes de la falta de síntesis de ELA (Fig.3) en la ATCC 9027. Se han reportado cepas de aislados clínicos con cambios en algunos aminoácidos de la proteína LasR, que reducen su actividad transcripcional (82). Sin embargo, ninguno de esos cambios reportados corresponde a los observados en la A-LasR con respecto a la P-LasR o P7-LasR.

Para analizar si los cambios A138V y E196D de la A-LasR están conservados en otras cepas de *P. aeruginosa*, se realizó un alineamiento global adicionando al análisis de la figura 5, las secuencias de LasR de 12 cepas de *P. aeruginosa* (Fig.6) tomadas de un alineamiento de 4189 secuencias de LasR.

Únicamente tres aislados presentan una identidad del 100% con la secuencia LasR que la cepa ATCC 9027, las cepas *P. aeruginosa* AUS217 (Aislado de una piscina de Australia), NCTC13628 (Aislado ambiental de Reino Unido), EML548 (Aislado



La posición 138 de LasR, forma parte del dominio de unión al autoinductor C12 y se encuentra al final de la alfa hélice 6 de la proteína. Asimismo, se ha reportado en otros miembros de la familia de reguladores de tipo LuxR la presencia de alanina, treonina, tirosina, serina o isoleucina en la posición 138 (82). Es posible que la variabilidad que se observa en la posición 138 de otras proteínas LuxR se deba a la naturaleza de cada uno de los autoinductores a los que se unen estos reguladores.

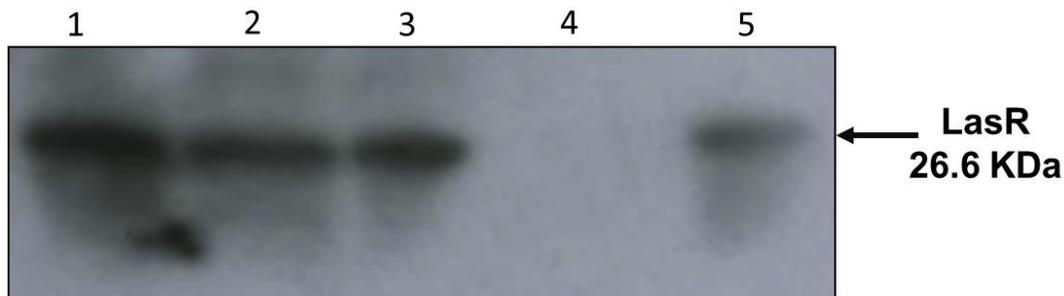
El aislado clínico CLJ1 es capaz de sintetizar ELA (61) y la cepa CR1, aislada de la rizosfera de una planta de Chile, es capaz de sintetizar RL y PIO (83), lo que indica que la presencia de una valina en la posición 138 no afecta la actividad de sus proteínas LasR. Esto debido a que LasR regula la síntesis de ELA y la síntesis del sistema Rhl, este último a su vez prende la síntesis de RL y PIO. Lo anterior sugiere que el cambio A138V en A-LasR pudiera no afectar su actividad transcripcional.

El cambio de E196D se encuentra dentro del dominio hélice-vuelta-hélice que le permite a la proteína LasR interactuar con el ADN (84), como se observa en el alineamiento de las secuencias de LasR (Fig.6), el ácido aspártico (D) solo se observa en la cepa ATCC 9027 en cambio, las otras cepas analizadas tienen un ácido glutámico (E) en esa posición.

El ácido aspártico y el ácido glutámico pertenecen al grupo de aminoácidos con cadenas laterales con carga negativa. La cadena lateral del ácido aspártico presente en la A-LasR es más corta que la cadena lateral del ácido glutámico presente en P-LasR y P7-LasR. Lo que sugiere que, al ser el ácido aspártico más corto, pudiera estar interfiriendo con la capacidad transcripcional de A-LasR.

#### **7.1.2. Síntesis de la proteína LasR de la cepa ATCC 9027 en medio LB.**

Otra posibilidad que explicaría la falta de síntesis de FV en la cepa ATCC 9027 en medio LB, sería que, bajo esta condición de cultivo, la proteína A-LasR no se está sintetizando. Para abordar esta posibilidad se realizó un ensayo de Western blot para detectar la presencia de la proteína A-LasR en la cepa ATCC 9027 cultivada en medio LB.



**Figura. 7. Detección de LasR por Western blot.** Orden de las muestras: 1. ATCC 9027/A-LasR, 2. ATCC 9027 silvestre, 3. PAO1 $\Delta$ *lasR*/A-LasR, 4. PAO1 $\Delta$ *lasR*, 5. PAO1 silvestre. A-LasR (pUCP24-*lasR* de ATCC 9027).

Como se observa en la figura 7, la cepa ATCC 9027 sintetiza A-LasR, incluso a niveles similares que la cepa de referencia PAO1. Así, la falta de producción de FV como ELA por la cepa de estudio no se debe a la ausencia de A-LasR. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el regulador transcripcional A-LasR está presente en la cepa ATCC 9027 pero que podría ser no funcional.

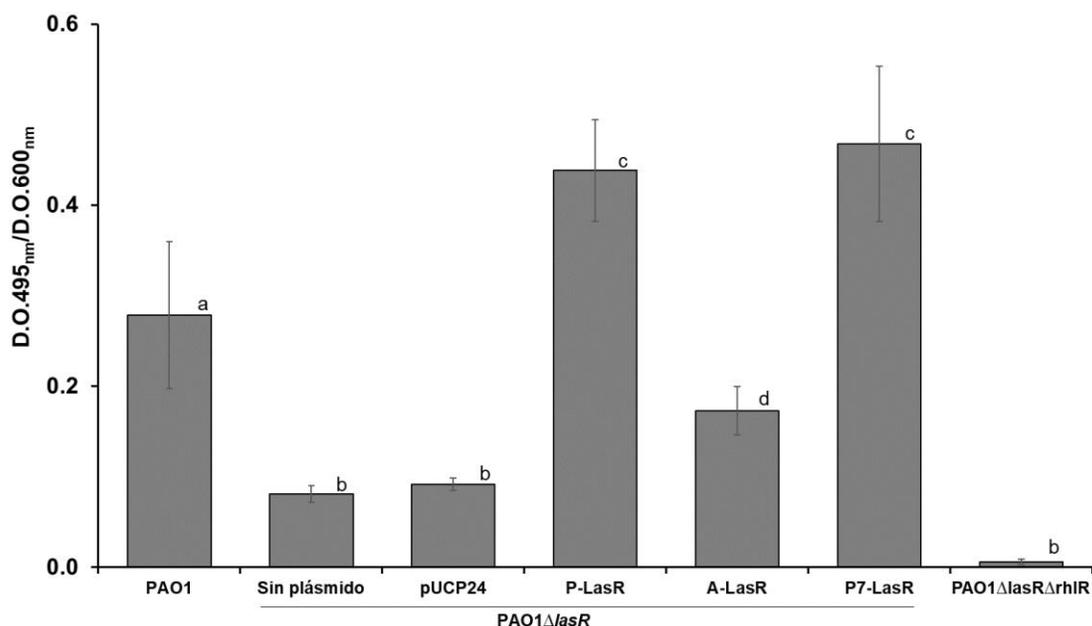
### 7.1.3. La proteína LasR de la cepa ATCC 9027 no es funcional como regulador transcripcional.

Para demostrar que la falta de síntesis de FV de la cepa ATCC 9027 en medio LB se debe a que su proteína A-LasR no es funcional, se cuantificó la actividad elastolítica de ELA en la cepa como una forma directa de conocer la actividad transcripcional de LasR, ya que el sistema Las regula la síntesis de ELA en *P. aeruginosa* activando la transcripción del promotor *lasB* (11, 38). La cepa PA7 sintetizó ELA a niveles similares a los de la cepa PAO1 cuando fue cultivada en medio LB (Fig.3), este resultado demostró que la cepa PA7 tiene una proteína LasR funcional, como sucede en la cepa CLJ1. Ambas cepas tienen valina en la posición 138 de LasR.

Sin embargo, la cepa ATCC 9027 fue incapaz de sintetizar ELA a pesar de expresar A-LasR (Fig.7), lo que sugiere que el cambio de E196D (Fig.6) es el responsable de la pérdida de actividad transcripcional de A-LasR (LasR de la ATCC 9027).

Con la finalidad de medir la actividad del regulador A-LasR, y poder compararlo con la actividad de las proteínas P-LasR y P7-LasR, se cuantificó la actividad elastolítica

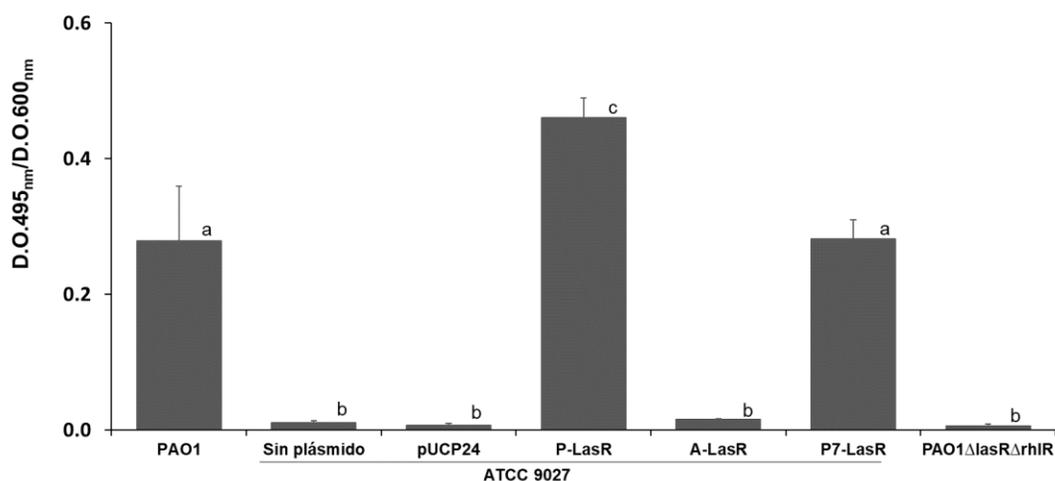
de ELA en la cepa PAO1 $\Delta$ lasR (38) que previamente se transformó con el plásmido pUCP24, que tenía clonadas las versiones de LasR de las cepas PAO1, PA7 y ATCC 9027 (Fig.8).



**Figura. 8. Cuantificación de la actividad elastolítica de la cepa PAO1 $\Delta$ lasR transformada con las diferentes versiones de LasR.** pUCP24: vector vacío, P-LasR: LasR de la PAO1, A-LasR: LasR de la ATCC 9027, P7-LasR: LasR de la PA7. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras.

Las versiones P-LasR y P7-LasR en la cepa PAO1 $\Delta$ lasR complementaron la mutación y causaron un incremento en la síntesis de ELA comparada con la cepa de referencia PAO1 (Fig.8). En cambio, la versión A-LasR ligeramente incrementó la síntesis de ELA en la cepa PAO1 $\Delta$ lasR, pero no a los niveles de la cepa de referencia (Fig.8). Sin embargo, cuando los mismos plásmidos fueron expresados en la cepa ATCC 9027, la versión P-LasR incrementó en la cepa la producción de ELA y con la versión P7-LasR, la cepa sintetizó ELA a los niveles de la PAO1 (Fig.9) contrario a lo que se obtuvo con la versión A-LasR, la cual no logró restaurar la

síntesis de este FV en la cepa ATCC 9027 (Fig.9). Para ambos experimentos la cepa PAO1 $\Delta$ lasR $\Delta$ rhIR se utilizó como control negativo.



**Figura. 9. Cuantificación de la actividad elastolítica de la cepa ATCC 9027 transformada con las diferentes versiones de LasR.** pUCP24: plásmido vacío, P-LasR: LasR de la PAO1, A-LasR: LasR de la ATCC 9027, P7-LasR: LasR de la PA7. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras.

Estos resultados demostraron que la versión A-LasR no es funcional en la misma cepa ATCC 9027, ya que la producción de ELA de la cepa ATCC 9027 y ATCC 9027/A-LasR son estadísticamente iguales. Se propone que la falta de actividad elastolítica se debe a la mutación E196D presente en la versión A-LasR.

#### **7.1.4. La producción de ramnolípidos depende de la presencia de una proteína LasR funcional.**

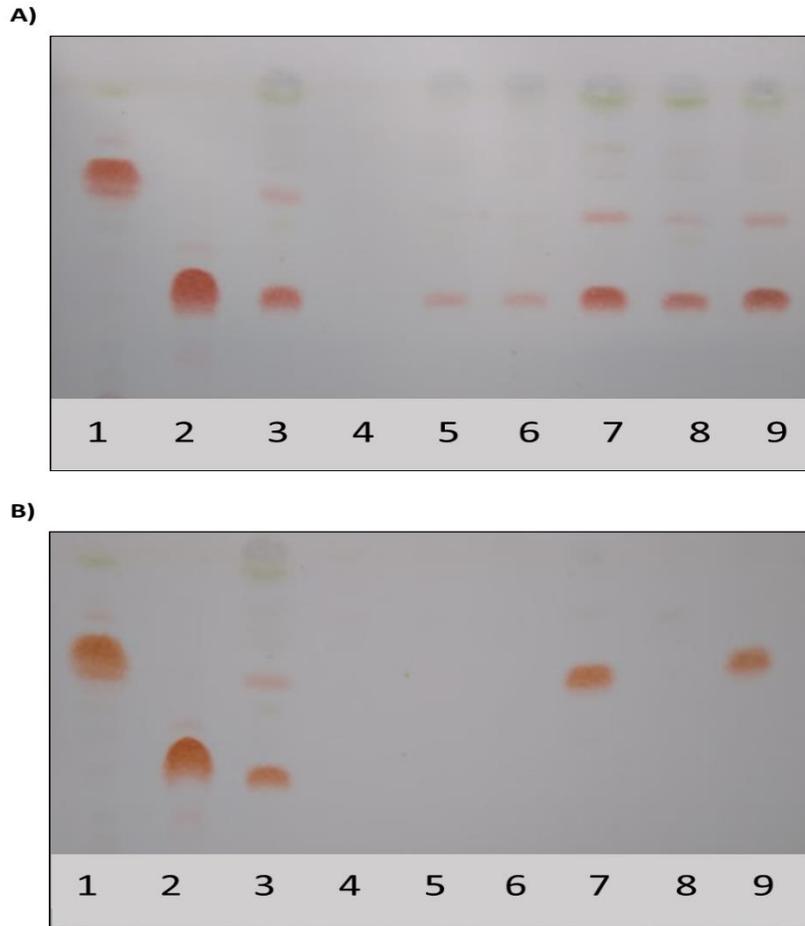
En medio LB, la producción de RL depende directamente de la activación de RhIR/C4, y a su vez la transcripción del gen *rhIR* depende de la presencia del regulador transcripcional LasR, por lo que otra forma de corroborar de manera indirecta el funcionamiento de A-LasR fue detectar la producción de RL en la cepa ATCC 9027 y PAO1 $\Delta$ lasR transformadas con las diferentes versiones A-LasR, P-

LasR y P7-LasR (Fig.10). La cepa ATCC 9027 no sintetiza RL en medio LB (Fig.10), lo que apoya la idea de que LasR es defectiva para activar sus genes blanco como *rhIR* y *rhII*.

La cepa PAO1 produce ambos RL, Mono-RL y Di-RL, mientras que la cepa ATCC 9027 únicamente produce Mono-RL cuando es cultivada en medio PPGAS (59), esto se debe a que esta cepa carece del gen *rhIC*. Esta característica es propia de las cepas que pertenecen a los grupo 3 de *P. aeruginosa* (48).

En las cepas PAO1 $\Delta$ *lasR* y ATCC 9027 la producción de RL muestra el mismo comportamiento que la ELA cuando son transformadas con las tres versiones de LasR. Esto es, la expresión de P-LasR y P7-LasR causaron un incremento en la producción de RL en la cepa PAO1 $\Delta$ *lasR* (Fig.10A), y en la cepa ATCC 9027 (Fig.10B). Mientras que A-LasR no causó un incremento en la producción de RL en ambos fondos genéticos. Estos resultados sugirieron que A-LasR (LasR de ATCC 9027) es incapaz de activar el gen *rhIR* y en consecuencia RhIR no está presente para sintetizar los RL ni ELA.

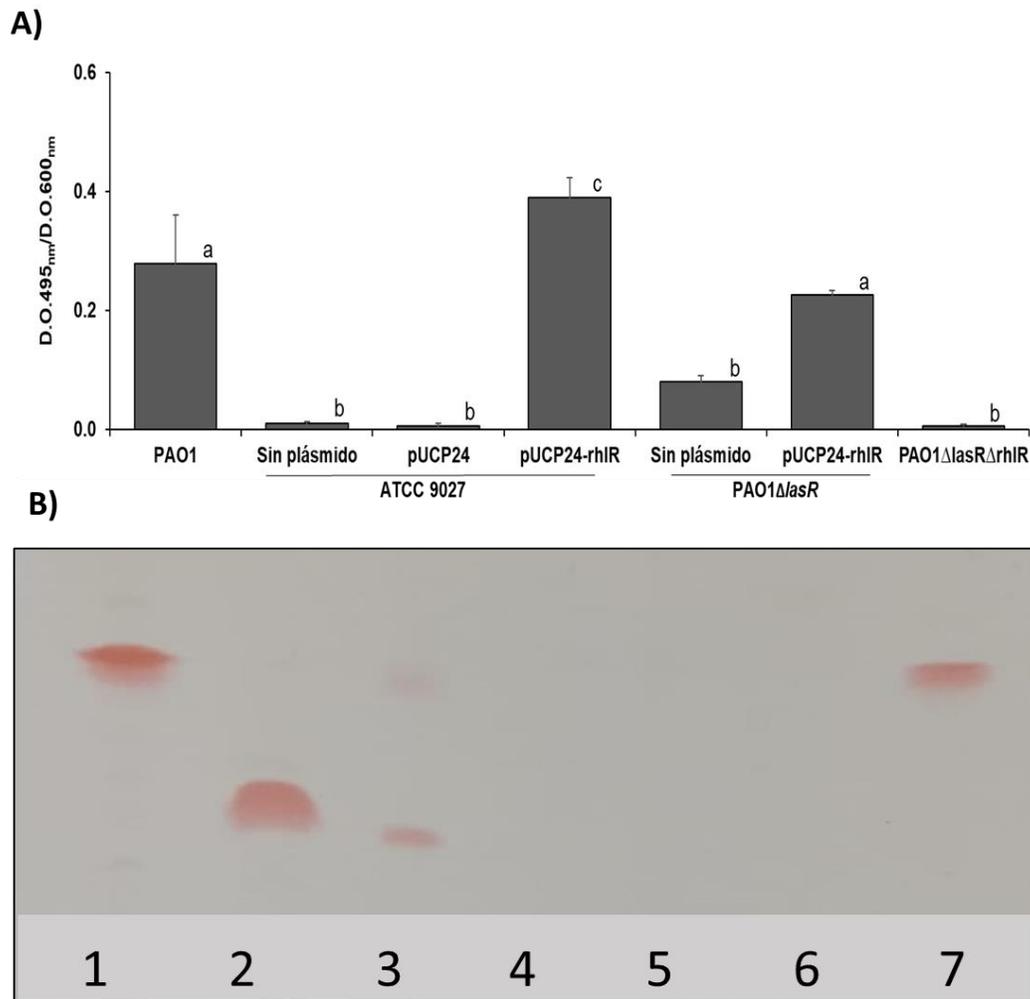
Para abordar esta hipótesis se cuantificó la producción de ELA y RL en las cepas ATCC 9027 y PAO1 $\Delta$ *lasR* sobreexpresando el gen *rhIR* (Fig.11).



**Figura. 10. Detección de ramnolípidos por cromatografía en capa fina.** (A) Producción de RL de la cepa PAO1 $\Delta$ lasR transformada con las diferentes versiones de LasR. Las líneas corresponden a 1. Mono-RL; 2. Di-RL; 3. PAO1; 4. PAO1 $\Delta$ rhIR (Control negativo de producción de RL); 5. PAO1 $\Delta$ lasR; 6. PAO1 $\Delta$ lasR/pUCP24; 7. PAO1 $\Delta$ lasR/P-LasR; 8. PAO1 $\Delta$ lasR/A-LasR; 9. PAO1 $\Delta$ lasR/P7-LasR. (B) Producción de RL por la cepa ATCC 9027 transformada con diferentes versiones de LasR. 1. Mono-RL; 2. Di-RL; 3. PAO1; 4. PAO1 $\Delta$ rhIR; 5. ATCC 9027; 6. ATCC 9027/pUCP24; 7. ATCC 9027/P-LasR; 8. ATCC 9027/A-LasR; 9. ATCC 9027/P7-LasR. pUCP24: vector vacío, P-LasR: LasR de la PAO1, A-LasR: LasR de la ATCC 9027, P7-LasR: LasR de la PA7.

Como se observa en la figura 11, la sobreexpresión de *rhIR* (versión de la PAO1, aunque PAO1 y ATCC 9027 tienen la misma secuencia de *rhIR*) en la cepa ATCC 9027 generó la sobreproducción de ELA (Fig.11A) y Mono-RL (Fig.11B), reforzando la hipótesis de que *rhIR* no se está expresando en cepa ATCC 9027 ya que la proteína A-LasR es poco funcional al menos en la PAO1 $\Delta$ lasR.

Previamente se reportó que además del sistema Las, RhIR/C4 hasta cierto punto puede activar la síntesis de *lasB* (11, 39). Por lo anterior, en la mutante *lasR* se observa ligeramente actividad elastolítica por ELA (Fig.11A), pero cuando en este fondo genético se sobreexpresó *rhIR*, se restauró la síntesis de ELA a los niveles de la PAO1. Por lo que RhIR/C4 también participa en la regulación de la producción de ELA tanto en la ATCC 9027 como en la PAO1 $\Delta$ *lasR*.



**Figura. 11. Cuantificación de la actividad elastolítica y producción de Mono-RL en la cepa ATCC 9027 y PAO1 $\Delta$  sobreexpresando *rhIR*.** (A) Actividad elastolítica en las cepas sobreexpresando a *rhIR*. pUCP24: vector vacío, pUCP24-*rhIR* (*rhIR* de PAO1). Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras. (B) Detección de RL en la cepa ATCC 9027 sobreexpresando *rhIR*. Línea 1. Estándar Mono-RL; 2. Estándar de Di-RL; 3.

PAO1; 4. PAO1 $\Delta$ *rhIR*; 5. ATCC 9027; 6. ATCC 9027/pUCP24; 7. ATCC 9027/pUCP24-*rhIR*.

#### **7.1.5. Análisis y expresión del promotor *lasB* de la cepa PAO1 y ATCC 9027.**

Otra posibilidad que podría estar afectando la producción de ELA en la cepa ATCC 9027 e involucrar el fenómeno de sobreproducción de este FV cuando se sobreexpresa *rhIR* (Fig.11A) es la región reguladora del gen *lasB*.

El promotor *lasB* de la PAO1 está conformado por dos secuencias operadoras, OP1 y OP2. El OP1 se encuentra en la posición -33 a -52 pb relativo al inicio de la transcripción, el OP2 se encuentra en la posición -94 a -112 pb relativo al inicio de la transcripción de *lasB*. Ambos operadores actúan de manera sinérgica para la activación del gen *lasB* y responden a LasR/C12 (40).

Para evaluar la hipótesis anterior, se realizó un alineamiento global del promotor de *lasB* de la cepa ATCC 9027, PA7 y PAO1 (Fig.12A). Se observa, que tanto la cepa ATCC 9027 como la PA7, tienen la misma secuencia OP2, que posee 12 pb entre los dinucleótidos CT y AG conservados, en lugar de los 11 pb que están presentes en la secuencia OP2 de la PAO1.

Se ha reportado que estos 12 pb entre los dinucleótidos invariables CT y AG son importantes para poder ser reconocidas por LasR/C12 (85). La secuencia que corresponde al OP1 es la misma en las tres cepas (Fig. 12A).

Para estudiar si los cambios en la secuencia del promotor *lasB* de la ATCC 9027 con respecto a la PAO1, pudieran afectar la síntesis de ELA. Se cuantificó la expresión del promotor *lasB* de la cepa ATCC 9027 (pMP220-PlasB-A) y PAO1 (pMP220-PlasB-P) en el fondo genético de la cepa PAO1.

A)

```

PA01_plasB      TGGGCCGAGCTGGCCTACAAGCTCGACGTCAACGAATTCGCGGCCAGGAAAGCGTGCAA 60
ATCC9027_plasB  TGGGCCGAGCTGGCCTATCGGCTCGACGTCAACGAGTTCGTTGGCCAGGAAAGCGTGCA 60
PA7_plasB       TGGGCCGAGCTGGCCTATCGGCTCGACGTCAACGAGTTCGTTGGCCAGGAAAGCGTGCA 60
*****

PA01_plasB      CTGATGATCGTCCACATGGCCCCCTCGCTGAGCGCGTCCCGGAGCT-GGGGGCAACCTAGC 119
ATCC9027_plasB  CTGATGGTTCGTCCACCTGGCGCCCCGCTGAAGGCCTGGGGCGGCAGCTGGCCAGCCTAGC 120
PA7_plasB       CTGATGGTTCGTCCACCTGGCGCCCCGCTGAAGGCCTGGGGCGGCAGCTGGCCAGCCTAGC 120
*****

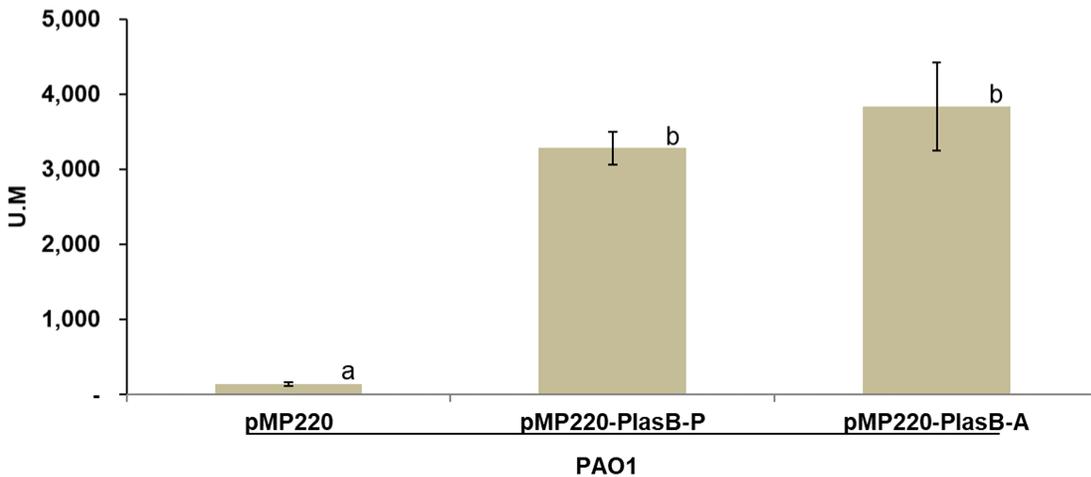
                OP2
PA01_plasB      TGCCACCTGCTTTTCTGCTAGCTATTCCAGCGAAAAACATACAGATTTCCGGCGAAATCAA 179
ATCC9027_plasB  TGCTGCTTGCTTTTCTGCTAGCTATTCCCGCGAAAAACATACAGATTTGCGGCGAAATCAA 180
PA7_plasB       TGCTGCTTGCTTTTCTGCTAGCTATTCCCGCGAAAAACATACAGATTTGCGGCGAAATCAA 180
*** *

                OP1
PA01_plasB      GGCTACCTGCCAGTCTTGGCAGGTTTGGCCGCGGGTTCCTTTTGGTACACGAAAGCACCG 239
ATCC9027_plasB  GGTCACCTGCCAGTCTTGGCAGGTTTGGCCGCGGGTTCCTTTTGGTACACGAAAGCACCG 240
PA7_plasB       GGTCACCTGCCAGTCTTGGCAGGTTTGGCCGCGGGTTCCTTTTGGTACACGAAAGCACCG 240
**

PA01_plasB      TC      241
ATCC9027_plasB TC      242
PA7_plasB       TC      242
**

```

B)



**Figura. 12. La expresión del promotor *lasB* no se afecta por los cambios en la secuencia OP2 de la cepa ATCC 9027.** (A) Alineamiento de la secuencia del promotor *lasB*, realizado con la herramienta Clustal omega de EMBOSS, entre la cepa PAO1, ATCC 9027 y PA7. Las secuencias OP1 y OP2 están delineadas, las secuencias conservadas CT y AG se encuentran resaltadas en rojo y las secuencias variables se encuentran resaltadas en color negro. (B) Expresión del promotor *lasB* de PAO1 y ATCC 9027 en el fondo genético de la cepa PAO1. Plásmido pMP220-PlasB-P (promotor *lasB* de PAO1), pMP220-PlasB-A (promotor *lasB* de ATCC 9027). Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias

significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras.

La expresión del promotor *lasB* de la cepa ATCC 9027 y PAO1 no mostraron diferencias significativas cuando son cuantificadas en el fondo genético de la cepa PAO1 que tiene una proteína LasR funcional.

Se observa en la figura 12B que, aunque la secuencia del promotor *lasB* de la cepa ATCC 9027 presenta algunas diferencias con respecto a la secuencia de la cepa PAO1, puede ser reconocido por P-LasR (LasR de la PAO1) y activarse. Esto incluye la secuencia OP2, que tiene 12 pb dentro de los dinucleótidos invariables CT y AG, y no 11 pb como en el caso de la PAO1, su transcripción no se afecta (Fig.12B). La presencia de 12 nucleótidos dentro de las secuencias invariables CT y AG ha sido reportada con anterioridad, en la caja *las-rhl* del promotor del gen *phzA1*, que es regulado de manera positiva por el regulador transcripcional RhIR (16). La secuencia OP2 de la cepa ATCC 9027, pudiera explicar la sobreproducción de ELA observada en la cepa cuando sobreexpresa *rhIR* (Fig.11A). Aunque si RhIR tuviera más afinidad por OP2 de la cepa ATCC 9027, se esperaría obtener mayor expresión del promotor de *PlasB-A* en el fondo genético de la PAO1, con respecto al promotor *PlasB-P*, pero contrario a esto, ambos promotores tienen la misma expresión (Fig.12B).

#### **7.1.6. Análisis y expresión del promotor *rhIR* de la cepa PAO1 y ATCC 9027.**

Hasta este momento, todos los resultados indican que A-LasR de la cepa ATCC 9027 tiene una actividad muy disminuida con respecto a la versión de la PAO1.

Cuando se sobreexpresó A-LasR en la cepa ATCC 9027 no se restauró la síntesis de ELA ni Mono-RL al nivel observado en la PAO1. Otra posibilidad que explicaría este fenómeno es que el promotor *rhIR*, que es regulado por LasR, tenga mutaciones que le impidan al gen expresarse. En la cepa de referencia PAO1, el promotor *rhIR* cuenta con dos sitios que son regulados de manera positiva por el sistema Las, llamados *las box 1* y *las box 3* (86).

Para abordar esta hipótesis, se realizó un alineamiento global de la secuencia del promotor *rhIR* de las cepas PAO1, PA7 y ATCC 9027 (Fig.13A).

Como se observa en el alineamiento mostrado en la figura 13, las secuencias del promotor de *rhIR* de la cepa ATCC 9027, así como de PA7, carecen de la secuencia *las box 1* (Fig. 13A), ya que el dinucleótido invariable CT se encuentra cambiado por un GA en estas cepas.

A)

```

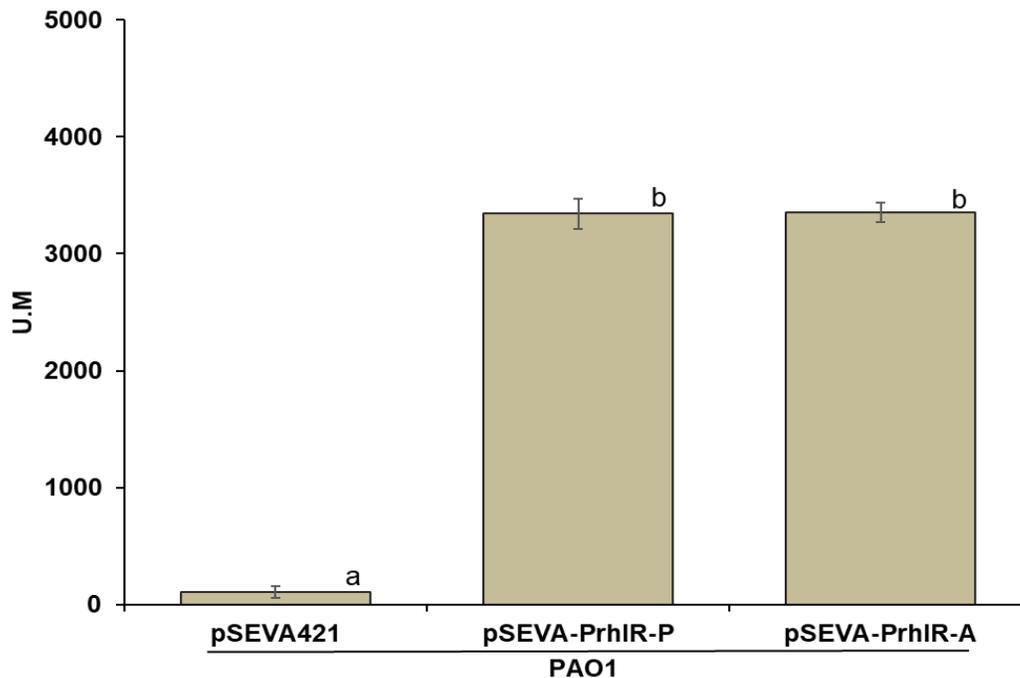
                                las box 3
PAO1_prh1R      GATGGCTGAAGGCTGCGTCCTGAACGGTGCCTGGCATAACAGATAGGGTTGCCATGATTTT 60
ATCC9027_prh1R GATGGCTGAAAGCCGCGTCCTGAGCCGTGCTGGCATAACAGATAGGATTGCCATGGTTTT 60
PA7_prh1R      GATGGCTGAAAGCCGCGTCCTGAGCCGTGCTGGCATAACAGATAGGATTGCCATGGTTTT 60
***** * * ***** * *****

                                las box 1
PAO1_prh1R      GCCGTATCGGCAAGGCTGCGCGCTTGACAGCGTCATACCCCGGGCCAATTCTGCTGTGAT 120
ATCC9027_prh1R GCCGTATCGGCAAGGGAGCACGCTTGACAGCGCCATACCCCGGGCCAATTCTGCTGCGAT 120
PA7_prh1R      GCCGTGTCGGCAAGGGAGCACGCTTGACAGCGCCATACCCCGGGCCAATTCTGCTGCGAT 120
***** * * ***** * *****

PAO1_prh1R      GCATTTTATCGATCAGGGCTTACTGCAATG 150
ATCC9027_prh1R GCATTTTATCGATCAGGGCTTACTGCAATG 150
PA7_prh1R      GCATTTTATCGATCAGGGCTTACTGCAATG 150
*****

```

B)



**Figura. 13.** La expresión del promotor *rhIR* de ATCC 9027 no se afecta por la falta de *las box 1*. (A) Alineamiento de la secuencia del promotor *rhIR*, realizado con la herramienta Clustal omega de EMBOSS, entre la cepa PAO1, ATCC 9027 y PA7. Las secuencias *las box 1* y *3* están delineadas, las secuencias conservadas CT y AG se encuentran resaltadas en rojo, las secuencias variables se encuentran

resaltadas en color negro y el ATG se encuentra en un recuadro azul. (B) Cuantificación de la fusión *prhIR::lacZ* del promotor *rhIR* de PAO1 y ATCC 9027 en el fondo genético de la cepa PAO1. Plásmidos utilizados: pSEVA421 (vector vacío), pSEVA-PrhIR-P (*prhIR* de PAO1), pSEVA-PrhIR-A (*prhIR* de ATCC 9027). Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras.

Para determinar si la mutación de la secuencia *las box 1* en la cepa ATCC 9027, afecta la transcripción del promotor *rhIR* en medio LB, se cuantificó su expresión. Ambas fusiones se expresaron a un nivel similar (Fig.13B), mostrando que la mutación de *las box 1* del promotor *rhIR* de la cepa ATCC 9027 no modifica la expresión del gen *rhIR* dependiente de LasR/C12 en el fondo genético de la PAO1.

En resumen, este primer capítulo, se determinó que la cepa ATCC 9027 tiene una proteína LasR no funcional probada en el fondo genético de la cepa ATCC 9027, aunque con actividad parcial cuando se prueba en el fondo genético de la mutante *lasR* de la cepa PAO1, que afecta de manera directa la síntesis de ELA y de manera indirecta la producción de Mono-RL en la cepa ATCC 9027 cuando es cultivada en medio LB.

La falta de síntesis de FV en este medio de cultivo, contribuyen a comprender el fenotipo no virulento de la cepa ATCC 9027 en ensayos de infección intraperitoneal previamente reportados en ratón (59).

## **7.2. Resultados y discusión del estudio de la mutación de *pqsR* de la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027.**

### **7.2.1. La cepa ATCC 9027 tiene una proteína PqsR no funcional.**

La cepa ATCC 9027 tiene una inserción de una guanina en la posición 753 de la secuencia del gen *pqsR* con respecto a la PAO1, la cual genera un cambio de marco de lectura en la secuencia de la proteína PqsR a partir del aminoácido 251 (Fig. 14). También se observa el cambio de un ácido glutámico por una lisina con respecto a la cepa PAO1 y PA7 en el aminoácido 43 (E43K), aunque este cambio es equivalente, solamente se encuentra conservado en la cepa ATCC 9027, cepas como CLJ1 y CR1, que pertenecen al grupo 3 de *P. aeruginosa* conservan el ácido glutámico en esa posición como la cepa de referencia PAO1 y PA7 (Fig. 14). La lisina es un aminoácido con carga positiva, mientras que el ácido glutámico tiene carga negativa, esto podría afectar la carga en esa región de la proteína, que se encuentra justamente a dos aminoácidos de distancia del dominio de unión al DNA reportado para PqsR, que se encuentra desde el aminoácido 21 al 40 (ISSAARILRKSHTAVSSAVS) (UniProt: Q9I4X0) (Fig.14). Ya sea el cambio E43K o la inserción de guanina pudieran afectar la actividad de este regulador transcripcional y que se comporte de forma similar a una mutante nula de *pqsR* de la cepa PAO1.

```

PA01      MPIHNLNHVNMFLQVIASGSISSAARILRKSHTAVSSAVSNEIDLCVELVRRDGYKVEP  60
PA7      MPIHNLNHVNMFLQVIASGSISSAARILRKSHTAVSSAVSNEIDLCVELVRRDGYKVEP  60
ATCC9027 MPIHNLNHVNMFLQVIASGSISSAARILRKSHTAVSSAVSNKIDLCVELVRRDGYKVEP  60
*****:*****

PA01      TEQALRLIPYMRSLLNYQQLIGDIAFNLNKGPRNLRVLLDTAIPPSFCDTVSSVLLDDFN  120
PA7      TEQALRLIPYMRSLLNYQQLIGDIAFNLNKGPRNLRVLLDTAIPPSFCDTVSSVLLDDFN  120
ATCC9027 TEQALRLIPYMRSLLNYQQLIGDIAFNLNKGPRNLRVLLDTAIPPSFCDTVSSVLLDDFN  120
*****

PA01      MVSLIRTSPADSLATIKQDNAEIDIAITIDEELKISRFNQCVLGYTKAFVVAHPQHPLCN  180
PA7      MVSLIRTSPADSLATIKQDNAEIDIAITIDEELKISRFNQCVLGYTKAFVVAHPQHPLCN  180
ATCC9027 MVSLIRTSPADSLATIKQDNAEIDIAITIDEELKISRFNQCVLGYTKAFVVAHPQHPLCN  180
*****

PA01      ASLHSIASLANYRQISLGSRSQGHSNLLRPVSDKVLVFNFDMLRLVEAGVGWGIAPHY  240
PA7      ASLHSIASLANYRQISLGSRFGQHSNLLRPVSDKVLVFNFDMLRLVEAGVVGYRAAL  239
ATCC9027 ASLHSIASLANYRQISLGSRFGQHSNLLRPVSDKVLVFNFDMLRLVEAGVGWGIAPHY  240
*****

PA01      FVEERLRNGTLAVLSELYEPGGIDTKVYCYNTALESERSFLRFLESARQRLRELGRQRF  300
PA7      FRRGAPTHRHPGRSQRAVRAGWHR-----YQGVLLL-----QHRAGVRAQLPALSRKRP  288
ATCC9027 FVEERLRAGTLGRSQRAVRAGRHR-----YQGVLLL-----QHRAGVRAQLPALSRKRP  289
* . . . * * * * * :. . * : * * : *

PA01      DDAPAWQPSIVETAQRRSGPKALAYRQRAAPE-----  332
PA7      P-----APARTGPAALRRGAGLAAEHRRDGATVLRPEGARVPAARRTRV  332
ATCC9027 P-----APARTGPAALRRGAGLAAEHRRDGATVLRPEGARVPAARRTRV  333
* * : * * * * *

```

**Figura. 14.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de PqsR, realizado con la herramienta Clustal omega de EMBOSS, entre la cepa PA01, PA7 y ATCC 9027. El aminoácido 251 se encuentra resaltado en color celeste, el aminoácido que se pierde de la cepa PA7 está resaltado con color amarillo, el cambio E43K está resaltado en color verde y la secuencia del dominio de unión al ADN de PqsR se encuentra marcado en negritas.

Una mutante *pqsR* de la PA01, es incapaz de sintetizar PIO (37) ni quinolonas (Fig.15B), al igual que la cepa ATCC 9027 cultivada en medio LB que no sintetiza PIO (Fig. 15A). Por la mutación que tiene la cepa ATCC 9027 en el gen *pqsR*, se esperaría que se comporte como una mutante *pqsR* de la cepa de referencia PA01, que no es capaz de sintetizar PIO (19) ni PQS/HHQ (Fig.15B). Debido a que PqsR activa la expresión del operón *pqsA-E*, que codifica las enzimas encargadas de sintetizar quinolonas. Adicionalmente, la mutación de *pqsR* impide la transcripción

del gen *pqsE* desde el promotor de *pqsA*, que se encuentra codificado en el operón *pqsA-E*, esto evita la síntesis de PqsE. Se sabe que esta proteína juega un papel primordial en la regulación de la síntesis de PIO a través del sistema Rhl de la PAO1 (37).

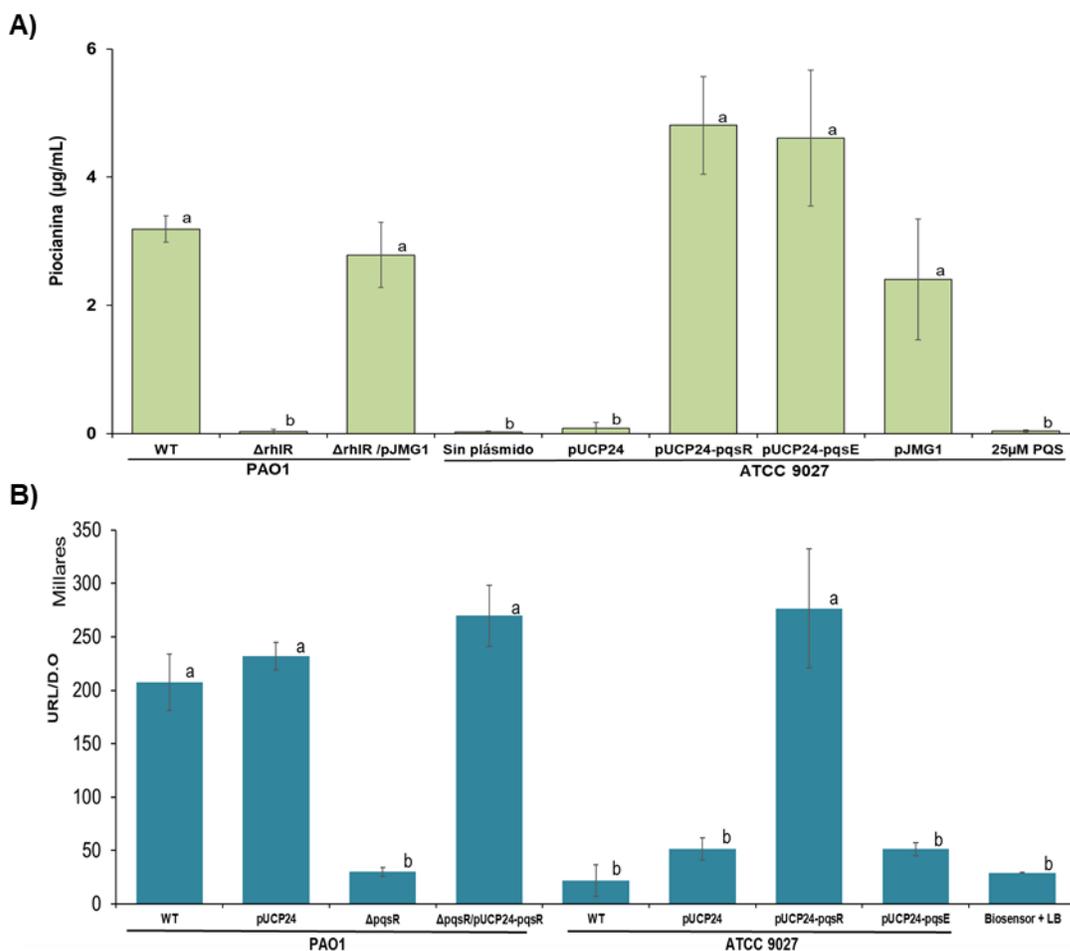
Para confirmar que la mutación de *pqsR* en la cepa ATCC 9027 es la causa de la pérdida de síntesis de PIO y quinolonas en medio LB, se transformó a la cepa con el gen *pqsR* de la cepa PAO1 clonado en el vector pUCP24 bajo un promotor constitutivo, y se cuantificó la producción de PIO y quinolonas, estas últimas se cuantificaron mediante un biosensor.

El biosensor para cuantificar quinolonas está construido en el fondo genético de la cepa PAO1 $\Delta$ *pqsA*, que es incapaz de sintetizar PQS/HHQ, y tiene una fusión transcripcional *pqsA::lux* insertada en el sitio *attB* del cromosoma (chromosomal phage attachment sites). La fusión se activa si se detecta PQS o HHQ en el sobrenadante de la cepa a analizarse.

Como se observa en la figura 15, el plásmido pUCP24-*pqsR*, restauró a los niveles de la PAO1, la síntesis de PIO (Fig.15A) y quinolonas (Fig.15B) de la cepa ATCC 9027 cultivada en medio LB. Estos resultados indicaron que la falta de una proteína PqsR funcional en la cepa de estudio limita su síntesis de PIO y quinolonas.

También el plásmido pUCP24-*pqsR* complementó la síntesis de PIO y quinolonas en la cepa PAO1 $\Delta$ *pqsR* (Fig.15B).

Adicionalmente se pensaba que la falta de síntesis de FV en la cepa ATCC 9027 podía deberse a que los niveles de PQS fueran limitantes, para ello, se realizó un experimento agregando en el medio de cultivo LB 25 $\mu$ M de PQS sintético (Sigma Aldrich) y se cuantificó la producción de PIO (Fig. 15A). La adición de PQS sintético no restauró la síntesis de PIO en la cepa ATCC 9027, lo que indica que PQS por sí solo no regula la expresión del operón *pqsA-E* si no que necesita unirse a la proteína PqsR funcional. Para comprobar la viabilidad del AI PQS sintético, se realizó la cuantificación de la expresión del promotor de *pqsA* en una mutante *pqsA* de la cepa PAO1 en presencia de 25 $\mu$ M de PQS sintético (Fig. 25 anexo 9.3).



**Figura. 15. Cuantificación de la producción de PIO (A) y quinolonas (B) en medio LB.** El plásmido pJMG1 (pUCP24-*rhIR* de PAO1), PQS sintético de sigma Aldrich, biosensor: PAO1 $\Delta pqsA$ -miniCTX::*PpqsA luxCDABE*. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras.

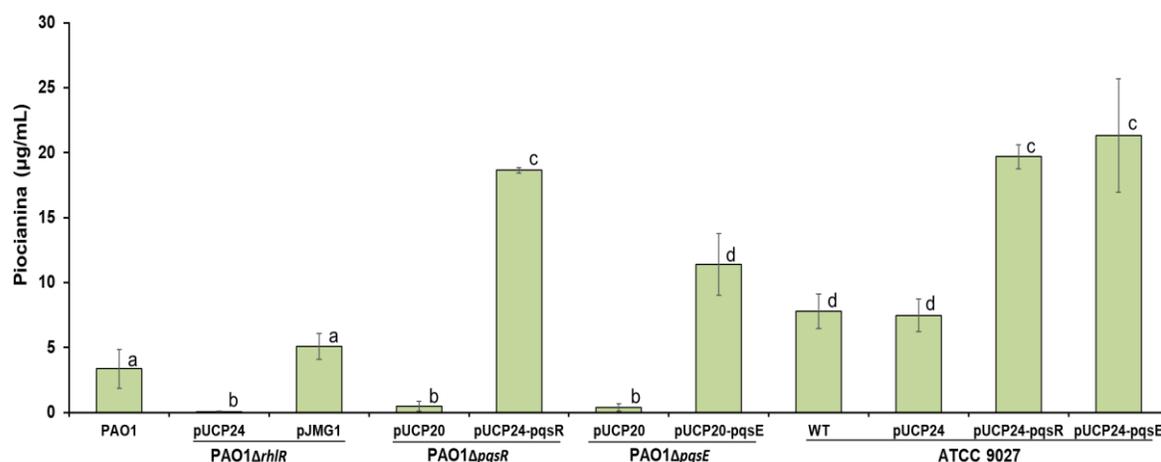
La proteína PqsE está involucrada en el fenotipo de producción de PIO a través del sistema Rhl, incluso se ha reportado que la sobreexpresión de esta proteína en una mutante *pqsR* de PAO1 restaura la síntesis de PIO (37). Para saber si la síntesis de PIO en la cepa ATCC 9027 también es regulada por la proteína PqsE, se transformó a la cepa con el plásmido pUCP24-*pqsE* y se cuantificó la producción de PIO en medio LB.

La sobreexpresión de PqsE en la cepa ATCC 9027 restauró la síntesis de PIO incluso a los niveles de la PAO1 (Fig.15A) en cambio no logró restaurar la síntesis

de quinolonas (Fig.15B) debido a que la síntesis de este AI depende de la presencia del regulador PqsR para que active la síntesis de las proteínas codificadas en el operón *pqsA-D*. Se ha reportado en la cepa PAO1, que la proteína PqsE participa en la síntesis de PQS y HHQ, y que la tioesterasa TesB presente en *Pseudomonas* (19), restaura en una mutante *pqsE* la síntesis de PQS y HHQ, pero no la capacidad de sintetizar PIO (37).

### 7.2.2. La cepa ATCC 9027 es capaz de sintetizar piocianina de manera independiente a PqsR cuando es cultivada en medio PPGAS.

En la cepa ATCC 9027 pese a tener una proteína PqsR mutante que afecta en medio LB la síntesis de PIO y quinolonas, se ha reportado que es capaz de sintetizar PIO cuando es cultivada en medio PPGAS (59).



**Figura. 16. Cuantificación de la producción de PIO en medio PPGAS.** Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras.

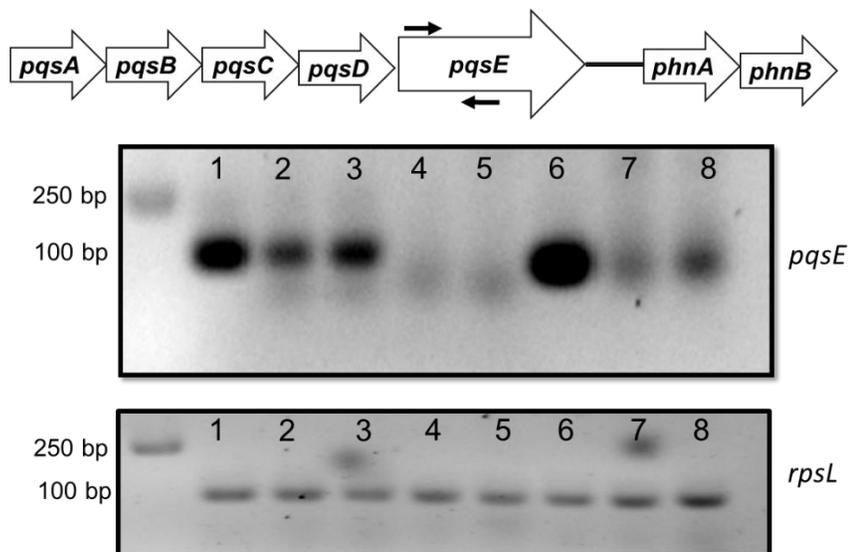
La cepa ATCC 9027, fue capaz de sintetizar PIO de manera independiente al regulador transcripcional PqsR cuando fue cultivada en medio PPGAS (Fig. 16) contrario a lo que sucede en una mutante *pqsR* de la cepa PAO1. Como se observa en la figura 16, la síntesis de PIO en la cepa de referencia también depende de la presencia de PqsE, como previamente lo reportó Farrow et al. 2008 (37), por lo que una mutante *pqsE* se abate su síntesis.

Adicionalmente, cuando se sobreexpresó *pqsR* o *pqsE* de la PAO1 en la cepa ATCC 9027, se observó que existe una sobreproducción de PIO en niveles comparables a los observados en la PAO1 y ATCC 9027. Este resultado demostró que PqsE aporta a la regulación de PIO en la cepa ATCC 9027 y que PqsR aporta de manera indirecta a la síntesis de PIO, activando la expresión del gen *pqsE* desde el promotor de *pqsA*.

La expresión de *pqsE* depende de que PqsR prenda la expresión del operón *pqsA-E*, sin embargo, se reportó en cepas de *P. aeruginosa* revertantes a auxótrofia de triptófano que tenían una mutación puntual G1041A dentro de la secuencia de nucleótidos de *pqsC*, que no cambia la secuencia de aminoácidos, pero que pueden expresar *pqsE* de manera independiente a PqsR, esto debido que ese cambio puntual generó un promotor interno dentro del operón *pqsA-E* que favorecía la expresión de *pqsE* y por lo tanto la producción de PIO (87).

#### **7.2.2.1. La síntesis de piocianina en la cepa ATCC 9027 es parcialmente dependiente de la expresión de PqsE.**

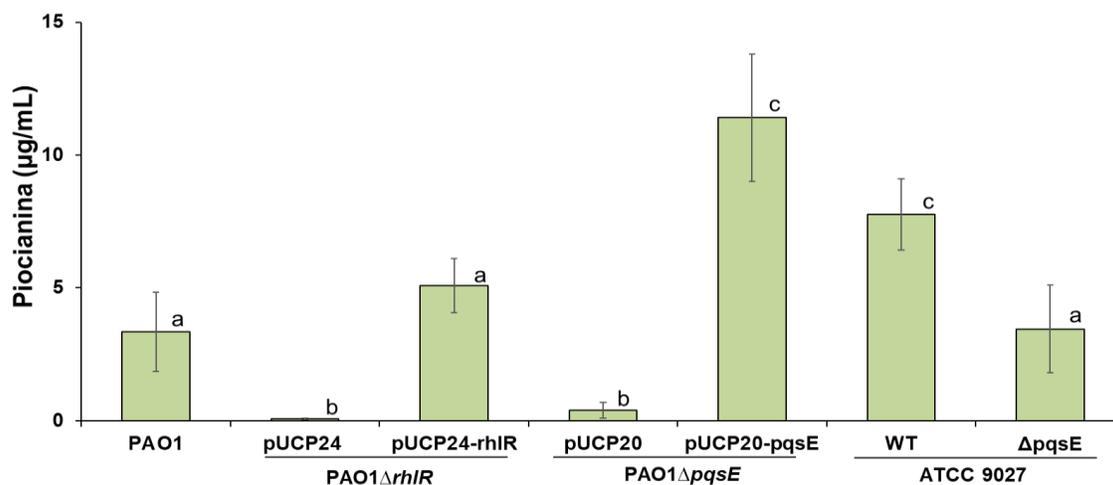
Se ha reportado que el mayor efecto del sistema de Pqs es la producción de FV mediante la expresión de *pqsE* a través de activar RhIR (31, 37). Así, nuestra hipótesis es que la cepa ATCC 9027 expresa *pqsE* de manera independiente de la activación que ejerce PqsR sobre el operón *pqsA-E*. Para determinar si esta hipótesis es correcta, se determinó mediante RT-PCR la expresión del gen *pqsE* en la cepa ATCC 9027 cultivada por 12 horas en medio PPGAS. Los datos se compararon con la cepa PAO1 $\Delta$ *pqsR* (Fig.17). También se realizó el experimento con las muestras de las cepas cultivadas en medio LB en donde la cepa ATCC 9027 no sintetizó PIO (Fig. 15A).



**Figura. 17. Determinación de la expresión de *pqsE* mediante RT-PCR en las cepas cultivadas 12h en medio LB y PPGAS.** Orden de las muestras en el gel de *pqsE*; 1) DNA PAO1; 2) cDNA PAO1 LB; 3) cDNA PAO1 PPGAS; 4) cDNA PAO1 $\Delta$ *pqsR* LB; 5) cDNA PAO1 $\Delta$ *pqsR* PPGAS; 6) DNA ATCC 9027; 7) cDNA ATCC 9027 LB; 8) cDNA ATCC 9027 PPGAS. *rpsL* fue utilizado como control interno del RT-PCR. Orden de las muestras en el gel de *rpsL*: 1) DNA PAO1; 2) DNA ATCC 9027; 3) CDNA PAO1 LB; 4) CDNA PAO1 PPGAS; 5) CDNA ATCC 9027 LB; 6) CDNA ATCC 9027 PPGAS; 7) CDNA PAO1 $\Delta$ *pqsR* LB; 8) CDNA PAO1 $\Delta$ *pqsR* PPGAS.

Los resultados mostraron que *pqsE* se expresó en la cepa ATCC 9027 en ambos medios de cultivo, siendo en medio PPGAS más predominante, aunque en menor cantidad que en la cepa PAO1. Esto sugiere que, la cepa ATCC 9027 en medio PPGAS es capaz de producir PIO a pesar de la falta de PqsR ya que puede sintetizar PqsE mediante un mecanismo que no está presente en la cepa PAO1. Como se esperaba, en la cepa PAO1 $\Delta$ *pqsR*, que no sintetiza PIO en PPGAS (Fig.16), no se expresó *pqsE* (Fig.17).

Para comprobar que la síntesis de PIO de la cepa ATCC 9027 en medio PPGAS depende de la presencia de PqsE, se mutó al gen *pqsE* en la cepa de estudio y se cuantificó su producción de PIO (Fig.18).



**Figura. 18. Cuantificación de la producción de PIO en la mutante *pqsE* de la cepa ATCC 9027 cultivada en medio PPGAS.** Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras.

En contraste con la PAO1Δ*pqsE*, que carece completamente de la síntesis de PIO, se observó que en la cepa ATCC 9027Δ*pqsE* se disminuyó la producción de PIO con respecto a la ATCC 9027 pero no se abatió como en la mutante *pqsE* de la PAO1, incluso la PIO sintetizada por la ATCC 9027Δ*pqsE* se mantuvo a niveles similares a los de la cepa PAO1 (Fig.18).

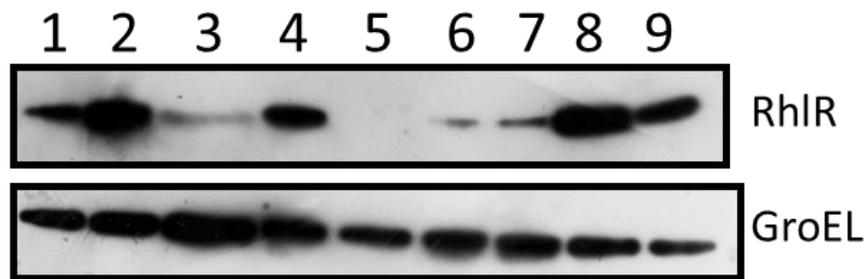
Estos datos indican que la cepa ATCC 9027 es capaz de sintetizar PIO en medio PPGAS porque sintetiza *pqsE* de manera independiente a PqsR, pero que la participación de esta proteína en la regulación de PIO cuando la cepa es cultivada en medio PPGAS es parcial, mecanismo que no ocurre en la PAO1 ni en la PA14 (19), pero que se ha observado en otros aislados como en la cepa de *P. aeruginosa* INP43 (comunicación personal de Abigail González-Valdez (Técnico académico del laboratorio de la Dra. Gloria Soberón).

### **7.2.3. La sobreexpresión de *pqsE* causa un incremento de la concentración de RhIR que resulta en la sobreproducción de picrocianina, pero no mejora la síntesis de ramnolípidos.**

Aunque la producción de PIO es solo parcialmente dependiente de PqsE en la cepa ATCC 9027, es aparente que la producción de este FV se incrementa al

sobreproducir PqsE (Fig.15A y 16). Los operones *phZA1-G1* y *phzA1-G2* son regulados de manera positiva por RhIR/C4 (16), por lo que una mutante *rhIR* es incapaz de sintetizar PIO (13, 37). También se ha reportado que PqsE regula la síntesis de PIO a través del sistema RhIR mediante un mecanismo que hoy en día se desconoce (19).

Para determinar si los niveles de la proteína RhIR incrementan en presencia de la sobreexpresión de *pqsE*, se realizó un ensayo de Western blot con las cepas cultivadas en medio PPGAS y que sobreproducen PqsE (Fig.19).

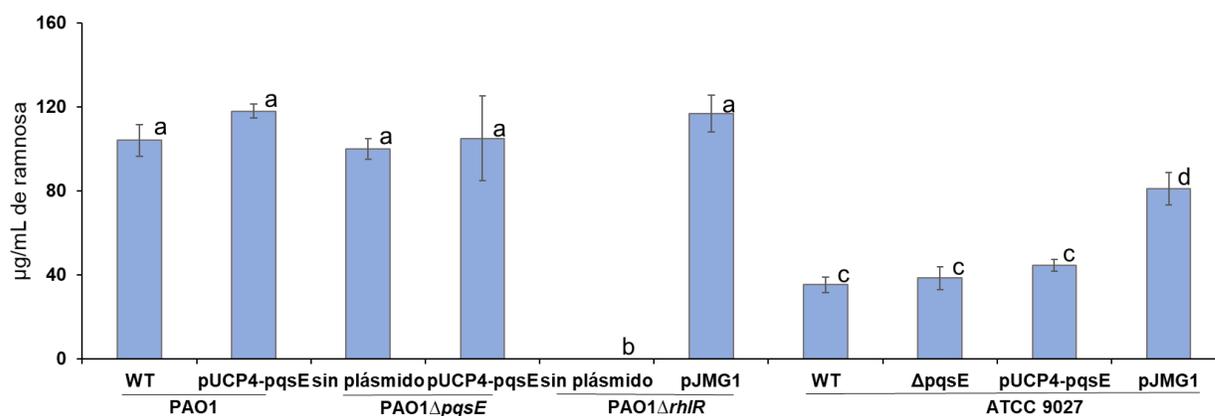


**Figura. 19.** Detección de la proteína RhIR mediante Western blot de las cepas cultivadas en medio PPGAS. Orden de las muestras: 1) PAO1; 2) PAO1/pUCP20-*pqsE*; 3) PAO1Δ*pqsE*; 4) PAO1Δ*pqsE*/pUCP20-*pqsE*; 5) PAO1Δ*rhIR*; 6) ATCC 9027; 7) ATCC 9027Δ*pqsE*; 8) ATCC 9027/pUCP24-*pqsE*; 9) ATCC 9027/pJMG1 (pUCP24-*rhIR* de PAO1). La proteína GroEL se utilizó como control de carga.

Como se observa en la figura 19, la sobreproducción de PqsE en la cepa ATCC 9027, generó un incremento en la concentración de proteína RhIR, lo que se tradujo en un incremento en la síntesis de PIO (Fig.16). Este fenómeno también se observó en la cepa de referencia PAO1, al sobreexpresar *pqsE* o al complementar la mutante *pqsE* (Fig.19). Es claro que la concentración de RhIR disminuyó en la PAO1Δ*pqsE*, generando falta de síntesis de PIO (Fig. 18), en cambio, cuando se complementa esta mutante con *pqsE*, se incrementaron los niveles de RhIR (Fig.19) y se restauró la síntesis de PIO (Fig. 18).

El medio de cultivo PPGAS se diseñó para la síntesis de RL (59), ya que se ha reportado que en condiciones de bajo fosfato se favorece la expresión de *rhIR* (88), que se encarga de la síntesis de RL.

Para estudiar si los niveles de RhIR generados por la sobreexpresión de *pqsE* se correlacionan con la producción de RL, así como sucedió con la síntesis de PIO, se cuantificó la producción de RL por el método de orcinol en las cepas de estudio (Fig. 20).



**Figura. 20. Cuantificación de la producción de RL en medio PPGAS mediante el método de orcinol.** Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras.

El incremento de la concentración de RhIR causado por la sobreexpresión de *pqsE* en las cepas ATCC 9027 o PAO1, no afectó la síntesis de RL como sucedió con la PIO. Incluso las mutantes *pqsE* de PAO1 y de ATCC 9027 produjeron los mismos niveles de RL que sus cepas silvestres (Fig. 20). Únicamente, cuando la cepa ATCC 9027 sobreexpresó *rhIR* se observó un incremento en la síntesis de RL, esto se debe a que RhIR junto con su AI C4 regulan de manera directa la síntesis de RL.

Estos resultados sugieren que existen dos formas de RhIR, una que actúa con su autoinductor C4 y que regula la síntesis de RL (RhIR<sup>C4</sup>) y la otra que es modificada por PqsE (RhIR<sup>E</sup>) que incrementa los niveles de producción de PIO en las cepas.

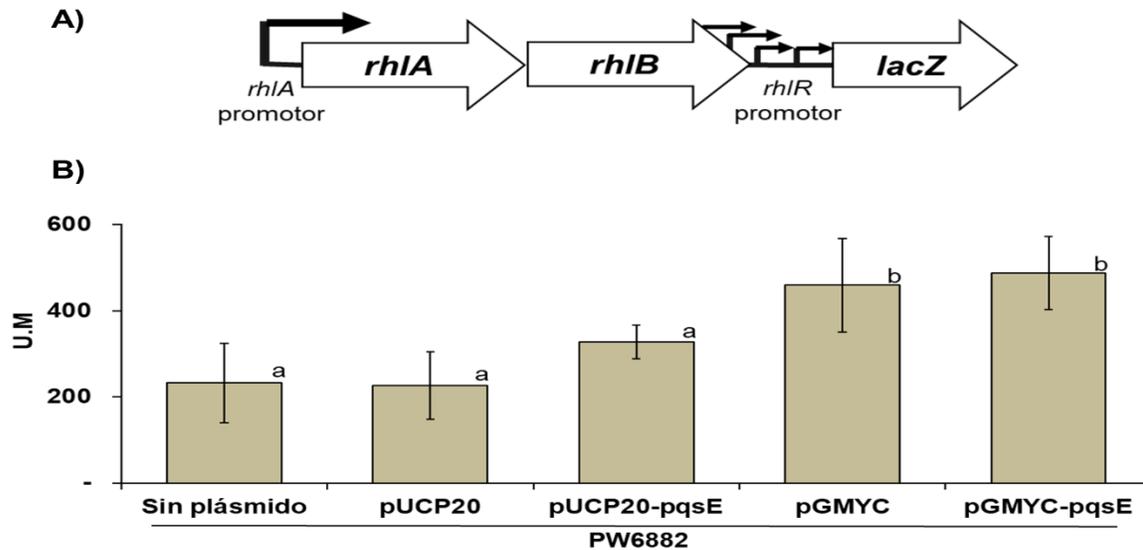
Estos resultados concuerdan con el transcriptoma reportado de la cepa PAO1Δ*pqsE* o en la PAO1 sobreexpresando *pqsE* en donde se observa que la expresión del operón *rhlAB* y del gen *rhIR* no se modifican comparado con la cepa silvestre PAO1,

mientras que los genes de síntesis de PIO fueron reprimidos en la PAO1 $\Delta$ *pqsE* e inducidos cuando se sobreexpresa *pqsE* (89).

Para comprender mejor el papel de RhIR<sup>E</sup> en la expresión del operón *rhIAB* se realizó un experimento utilizando a la cepa PAO1 (PW6882) (86) que tiene la secuencia *rhIR* interrumpida por Tn'*lacZ* en fase, así se puede cuantificar la expresión de los cinco promotores de *rhIR* (cuatro se encuentran río arriba de la secuencia estructural de *rhIR*, y otro es el promotor del gen *rhIA*) (Fig. 21A). La cepa PW6882 también contiene el plásmido pGMYC (pUCP20-*rhIR*) o el plásmido pGMYC-*pqsE* (pUCP20-*rhIR*-*pqsE*).

La expresión del promotor *rhIA* es estrictamente dependiente de RhIR, y se ha reportado que a 37°C se forma un asa de regulación positiva en el que RhIR se transcribe a partir del promotor de *rhIA* formando el operón *rhIAB-R* (45, 86). Así, si RhIR<sup>E</sup> modificado por PqsE es capaz de activar preferentemente la expresión del promotor *rhIA*, que pudiera mejorar la producción de RL, esta actividad transcripcional podría causar el incremento en la concentración de RhIR cuando PqsE es sobreexpresado.

Los resultados obtenidos indicaron que el nivel de transcripción de *rhIR* es el mismo cuando se sobreexpresa *rhIR* o *rhIR* con *pqsE* en la cepa PW6882 (Fig. 21B). Estos resultados concordaron con el experimento de cuantificación de RL en donde la sobreexpresión o mutación PqsE no afectó ni mejoró la síntesis de RL en la PAO1 ni en la cepa ATCC 9027.



**Figura. 21. Cuantificación de la expresión de los promotores de *rhIR*.** (A) Contexto genómico de los promotores de *rhIR* en fusión transcripcional de la cepa PW6882; (B) Cuantificación de la expresión de los cinco promotores de *rhIR*. pUCP20: plásmido vacío, pGMYC (pUCP20-*rhIR* de PAO1). Los experimentos fueron realizados por triplicado. Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras.

Previamente se reportó que la sobreexpresión de PqsE genera un incremento en la producción de RL (31, 37); estos resultados no concuerdan con los observados en la figura 20. Esta discrepancia podría deberse a que esos estudios fueron realizados en medio de cultivo LB en donde la síntesis de RL es muy baja, así como el método de cuantificación de RL utilizado (31).

Estos resultados mostraron que la producción de RL no se afecta por la actividad de PqsE en las cepas PAO1 y ATCC 9027, así como que aparentemente existen dos formas de RhIR, una acoplada al AI C4 y otra modificada por PqsE (RhIR<sup>E</sup>) que tiene una especificidad diferente. La existencia de dos formas de RhIR con diferente especificidad de promotores se reportó anteriormente (80). Sin embargo, los resultados generados en esta tesis muestran por primera vez que los genes implicados en la producción de PIO son preferencialmente (en la cepa ATCC 9027) o absolutamente (en la cepa PAO1) (Fig.16), expresados por la versión RhIR<sup>E</sup>

(modificado por la actividad de PqsE), mientras que la expresión del promotor del operón *rhIAB* (Fig.20), responsable de la síntesis de RL, es independiente de PqsE.

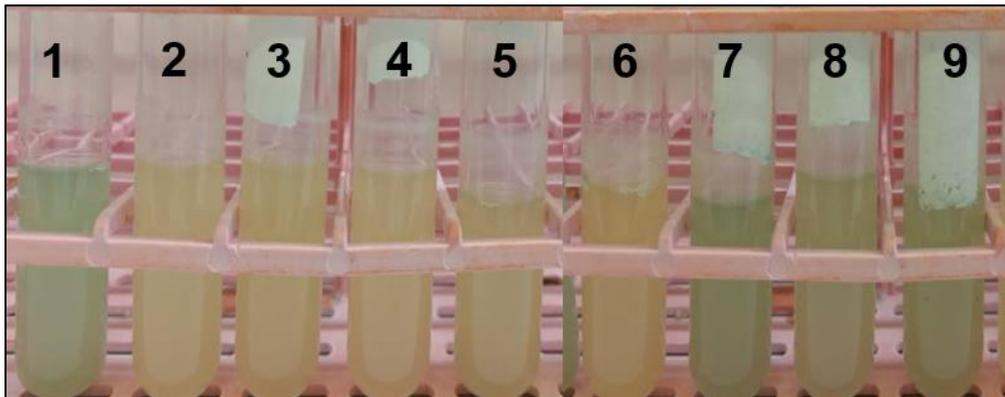
Adicionalmente, estos resultados sugirieron que la actividad de PqsE consiste en incrementar la estabilidad de la proteína RhIR como previamente fue reportado (37), y que la sobreexpresión de RhIR mediante la acción de PqsE muestra diferente especificidad de promotores. Esto significa que la versión RhIR<sup>E</sup> preferencialmente expresa a los genes involucrados en la síntesis de PIO (Fig.16) sobre los que se encargan de la síntesis de RL (Fig.20).

Los resultados reportados previamente con la cepa PA14 sobre la especificidad del promotor de RhIR<sup>E</sup> (80) no concuerdan con los resultados presentados en esta tesis, ya que se reportó que el promotor *rhIA* depende tanto de RhIR/C4 como de RhIR<sup>E</sup>, mientras que los datos obtenidos en estos experimentos se demuestra que la producción de RL y la transcripción del promotor *rhIA* no son afectados por PqsE. Es importante señalar que esta diferencia en resultados podría deberse al uso de diferentes cepas ya que ellos utilizaron a la cepa PA14 y en esta tesis utilizamos a la cepa PAO1, incluso las diferencias pueden deberse a las condiciones de cultivo utilizadas, al uso de plásmidos para medir la expresión génica, ya en los experimentos realizados en esta tesis se utilizó una inserción cromosómica para determinar la transcripción de *rhIA*.

El estudio de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta de DQ de diferentes aislados de *P. aeruginosa* es de gran importancia para entender la compleja red reguladora implicada en la expresión de diferentes rasgos asociados a la virulencia y poder diseñar una estrategia racional que permita utilizarse para tratar las infecciones causadas por esta bacteria. Esta tesis contribuye a la comprensión de esta red reguladora en una cepa que pertenece al clado PA7 o grupo 3 de *P. aeruginosa*, hasta ahora poco estudiado, así como también brinda información adicional sobre la respuesta de DQ de la cepa tipo PAO1.

### 7.2.3.1 Estudio del papel de PqsE como regulador de la síntesis de piocianina en la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1.

También se abordó la posibilidad de que la proteína PqsE estuviera sintetizando un autoinductor que actuaría con RhIR, como fue reportado por Mukherjee et al. 2018 (80), solo que en ese reporte no incluyeron una fusión transcripcional del promotor *phzA1* el cual es importante para la síntesis de PIO y que es regulado por RhIR. Para ello, se realizaron extractos de los sobrenadantes de las cepas PAO1, PAO1 $\Delta$ *pqsE*, PAO1 $\Delta$ *pqsE*/pUCP24-*pqsE*, y se adicionaron por separado a la cepa PAO1 $\Delta$ *pqsE*. Esta mutante no sintetiza PIO, y si PqsE sintetiza un autoinductor cuando se le adicione el extracto de la cepa PAO1 $\Delta$ *pqsE*/pUCP24-*pqsE*, se espera que la cepa restaure la síntesis de PIO. Como control positivo, se utilizó el extracto de la cepa PAO1 y como control negativo se utilizó al extracto de la cepa PAO1 $\Delta$ *pqsE*. También se realizó un ensayo, pero con la cepa PAO1 $\Delta$ *rhII*, que es incapaz de sintetizar PIO por la falta del autoinductor C4, si los extractos fueron correctamente obtenidos al adicionar el extracto de la cepa PAO1 $\Delta$ *pqsE*, que tiene C4 (ya que esta mutante es capaz de sintetizar RL), la cepa PAO1 $\Delta$ *rhII* restaurará la síntesis de PIO.

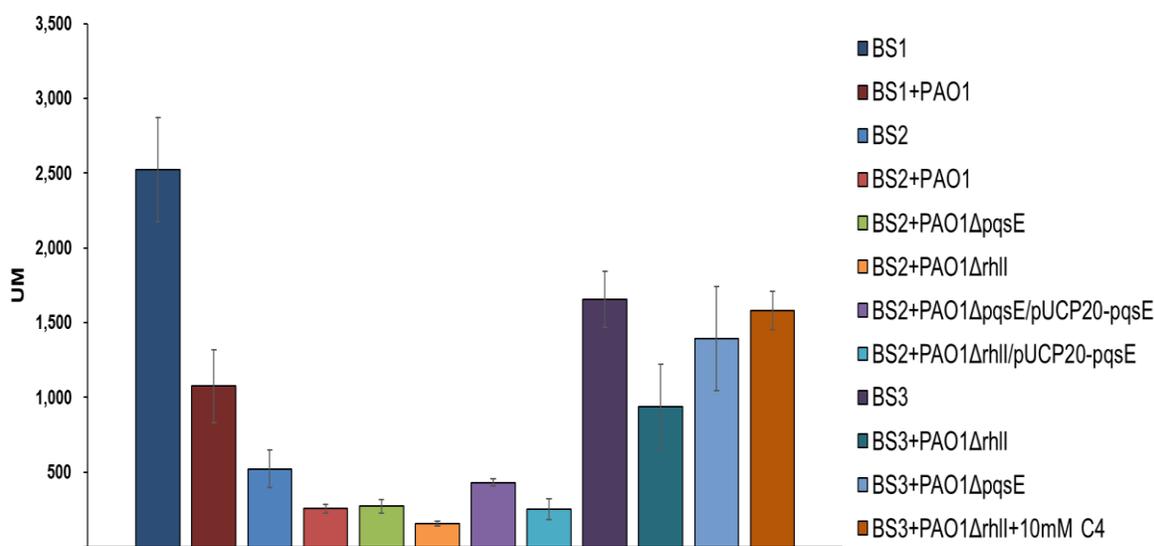


**Figura. 22 Producción de PIO que se obtuvo con los extractos de acetato de etilo.** Muestras: 1) PAO1 (Control positivo de producción). Cepa PAO1 $\Delta$ *pqsE* con extractos de: 2) Metanol, 3) PAO1, 4) PAO1 $\Delta$ *pqsE*, 5) PAO1 $\Delta$ *pqsE*/pUCP20-*pqsE*. Cepa PAO1 $\Delta$ *rhII* con extractos de: 6) Metanol, 7) PAO1, 8) PAO1 $\Delta$ *pqsE*, 9) PAO1 $\Delta$ *pqsE*/pUCP20-*pqsE*.

Como se observa en la figura 22, ninguno de los extractos probados logró restaurar la síntesis de PIO en la cepa PAO1 $\Delta$ *pqsE*, incluso cuando se le adicionó el extracto

de la cepa PAO1. La cepa PAO1 $\Delta$ *rhII* (que tiene una proteína PqsE funcional), logró restaurar la síntesis de PIO cuando se le adicionan los extractos. Los resultados indicaron que, para la síntesis de PIO, la cepa forzosamente necesita tener una proteína PqsE funcional y dentro de la célula.

Para corroborar este fenómeno de importancia en la síntesis de PIO, se realizaron co-cultivos utilizando cepas biosensores que contenían una fusión transcripcional del promotor *PphzA1::lacZ*. El biosensor uno fue PAO1/pMP220-*PphzA1::lacZ*, el biosensor dos fue la cepa PAO1 $\Delta$ *pqsE*/pMP220-*PphzA1::lacZ* y el biosensor tres fue la cepa PAO1 $\Delta$ *rhIII*/pMP220-*PphzA1::lacZ*.



**Figura. 23 Cuantificación de la transcripción de *PphzA1* en co-cultivo.**

Como se observa en la figura 23, no se restauró la expresión de *PphzA1* en la cepa PAO1 $\Delta$ *pqsE* (BS2) cuando fue co-cultivada con las cepas PAO1, PAO1 $\Delta$ *pqsE*, PAO1 $\Delta$ *pqsE*/pUCP20-*pqsE* y PAO1 $\Delta$ *rhIII*/pUCP20-*pqsE* (Fig.23), lo que sugiere que para la expresión de este promotor se requiere la presencia de PqsE en la cepa.

El biosensor BS3 que consiste en la cepa PAO1 $\Delta$ *rhIII*/pMP220-*PphzA1::lacZ* restauró la expresión del promotor *phzA1* a los niveles de la PAO1 cuando fue co-cultivada con las cepas PAO1 $\Delta$ *rhIII* (no sintetiza C4) y PAO1 $\Delta$ *pqsE* (no sintetiza el autoinductor de PqsE) (Fig.23). El BS3 a diferencia del BS2, tiene un *pqsE* funcional, lo que sugiere que al igual que el experimento realizado con los extractos de acetato

de etilo, para la síntesis de PIO se requiere que la cepa tenga una proteína PqsE funcional y no depende de que PqsE genere un autoinductor.

## **8. Conclusiones.**

La cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027 tiene una proteína LasR no funcional debido al cambio de un ácido glutámico por un ácido aspártico en la posición 196 de la secuencia LasR con respecto a las cepas de referencia PAO1 y PA7. La falta de una LasR funcional ocasiona la pérdida de la síntesis de ELA, PIO y Mono-RL cuando es cultivada en medio LB ya que bajo esta condición el sistema Las se encuentra en la cima de la jerarquía del sistema de DQ.

La cepa ATCC 9027 al igual que la cepa de referencia del clado PA7 es mutante PqsR. Pese a esta mutación, es capaz de sintetizar PIO y Mono-RL cuando es cultivada en medio PPGAS. Esta síntesis de PIO es parcialmente dependiente de la proteína PqsE. En cambio, en la cepa PAO1, la síntesis de PIO es completamente dependiente de PqsE.

La sobreexpresión de *pqsE* en la cepa ATCC 9027 y en la cepa PAO1, genera un incremento en la concentración de la proteína RhIR, que resulta en la sobreproducción de PIO, pero no mejora la síntesis de RL, FV que depende del sistema Rhl.

Por lo anterior, se propone que en *P. aeruginosa* existen dos formas de RhIR, una modificada por el AI C4 que se encarga de regular la producción de RL y una forma de RhIR modificada por PqsE que se encarga de regular la síntesis de PIO, esta forma de RhIR no depende de que PqsE sintetice un autoinductor.

Estudiar cómo se regulan los FV en cepas que pertenecen al clado PA7 es de suma importancia ya que nos permite conocer si los mecanismos de regulación de estos son iguales o diferentes entre distintos clados de *P. aeruginosa*. Esto permite proponer nuevos blancos terapéuticos para dar tratamiento a infecciones por esta bacteria.

## 9. Anexos

### 9.1. Listas de cepas y plásmidos utilizados.

**Tabla 1.** Cepas y plásmidos utilizados en el estudio de la mutación LasR de la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027.

Cepas	Características	Fuente
<b><i>P. aeruginosa</i></b>		
PAO1	Cepa silvestre de la sublínea MPAO1, aislada en Australia en 1950 de una herida de quemadura.	(90)
PAO1 $\Delta lasR \Delta rhIR$	PAO1 doble mutante derivada $lasR::\Omega$ , Tet <sup>R</sup> $rhIR::\Omega$ , Sm <sup>R</sup>	(38)
PAO1 $\Delta lasR$	PAO1 mutante derivada $lasR::\Omega$ , Tet <sup>R</sup>	(38)
ATCC 9027	Aislada de una infección de oído externo.	ATCC
PA7	Aislado clínico de una infección no respiratoria en Argentina.	(47)
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	$\phi 80\Delta lacZ\Delta M15\Delta [lacZYA-argF]U169$ $endA recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44$	Invitrogen
<b>Plásmidos</b>		
pJET 1.2 blunt	Vector de clonación	Thermo Scientific
pJET1.2-P-LasR	Gen <i>lasR</i> de la cepa PAO1 clonado en el plásmido pJET 1.2 blunt	Este estudio
pJET1.2-A-LasR	Gen <i>lasR</i> de la cepa ATCC 9027 clonado en el plásmido pJET 1.2 blunt	Este estudio
pJET1.2-P7-LasR	Gen <i>lasR</i> de la cepa PA7 clonado en el plásmido pJET 1.2 blunt	Este estudio
pUCP24	Vector de clonación; <i>plac</i> Gm <sup>R</sup> capaz de replicarse en <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i>	(91)
pUCP24-PlasR	Gen <i>lasR</i> de la cepa PAO1, clonado en el vector pUCP24 ( <i>plac-lasR</i> ), Gm <sup>R</sup>	Este estudio
pUCP24-AlasR	Gen <i>lasR</i> de la cepa ATCC 9027, clonado en el vector pUCP24 ( <i>plac-lasR</i> ), Gm <sup>R</sup>	Este estudio
pUCP24-P7lasR	Gen <i>lasR</i> de la cepa PA7, clonado en el vector pUCP24 ( <i>plac-lasR</i> ), Gm <sup>R</sup>	Este estudio
pMP220	Derivado de pTJS75, contiene el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> clonado sin el promotor	(92)

	<i>lac</i> , pero con el sitio de unión al ribosoma. Tiene el sitio de clonación proveniente del plásmido pIC20H. Este plásmido es utilizado para construir fusiones transcripcionales. Tet <sup>R</sup>	
pMP220-plasB-P	Promotor <i>lasB</i> de la cepa PAO1 clonado en el plásmido pMP220	Este estudio
pJET1.2-plasB-P and	Promotor <i>lasB</i> de la cepa PAO1 clonado en el plásmido pJET 1.2 blunt	Este estudio
pMP220-plasB-A	Promotor <i>lasB</i> de la cepa ATCC 9027 clonado en el plásmido pMP220	Este estudio
pJET1.2-plasB-A	Promotor <i>lasB</i> de la cepa ATCC 9027 clonado en el plásmido pJET 1.2 blunt	Este estudio
pSEVA421	Vector para fusiones transcripcionales capaz de replicarse en <i>P. aeruginosa</i> . Sm <sup>R</sup>	(72)
pSEVA-PrhIR-P	Promotor del gen <i>rhIR</i> de la cepa PAO1, clonado en el plásmido pSEVA421. Sm <sup>R</sup>	Este estudio
pSEVA-PrhIR-A	Promotor del gen <i>rhIR</i> de la cepa ATCC 9027, clonado en el plásmido pSEVA421. Sm <sup>R</sup>	Este estudio
pUCP24- <i>rhIR</i> (pJMG1)	Gen <i>rhIR</i> de la cepa PAO1 clonado en el plásmido pUCP24. Gm <sup>R</sup>	(59)
pUJ9	Plásmido para construir fusiones traduccional, contiene el gen reportero <i>lacZ</i> . Ap <sup>R</sup>	(93)
pUJRhIR-P	Plásmido derivado del pUJ9 que contiene la fusión traduccional <i>rhIR'</i> - <i>lacZ</i> de la cepa PAO1. Ap <sup>R</sup>	Este estudio
pUJRhIR-A	Plásmido derivado del pUJ9 que contiene la fusión traduccional <i>rhIR'</i> - <i>lacZ</i> de la cepa ATCC 9027. Ap <sup>R</sup>	Este estudio

**Abreviatura de los antibióticos:** Sm<sup>R</sup>:Estreptomina, Tet<sup>R</sup>:Tetraciclina, Gm<sup>R</sup>:Gentamicina, Ap<sup>R</sup>:Ampicilina.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para construir los plásmidos listados en la tabla 1.

Oligonucleótido	Secuencia 5´ - 3´	Sitio de restricción
-----------------	-------------------	----------------------

LasRFWBamHI	ACTCAGGATCCATGGCCTTGGTTGACGGTT	<i>Bam</i> HI
LasRRVHindIII	ACTCAAAGCTTTCAGAGAGTAATAAGACCCAAAT	<i>Hind</i> III
PLasBFWBgIII	AGTAAGCTTAGATCTTGGGCCGAGCTGGCCTA	<i>Bg</i> II
PLasBFWPstI	AGTCCTGCAGTCGACGGTGCTTTCGTGTACC	<i>Pst</i> I
PrhIRFWEcoRI	CCGGAATTCGAGCCTTGCTGCCATCGT	<i>Eco</i> RI
PrhIRRVBamHI	CGCGGATCCAAAAAGCCTCCGTCATTCCT	<i>Bam</i> HI

**Tabla 3.** Cepas y plásmidos utilizados en el estudio de la mutación *pqsR* de la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027.

<b>Cepas</b>		
<b><i>P. aeruginosa</i></b>		
PAO1	Cepa silvestre de la sublínea MPAO1, aislada en Australia en 1950 de una herida de quemadura.	(90)
PAO1 $\Delta$ <i>pqsA</i> -miniCTX:: <i>PpqsA luxCDABE</i>	CTX:: <i>PpqsA luxCDABE tet</i> <sup>R</sup>	(94)
PAO1 $\Delta$ <i>pqsR</i>	PAO1 mutante derivada <i>pqsR</i> :: $\Omega$ , Apra <sup>R</sup>	Este estudio
PAO1 $\Delta$ <i>pqsE</i>	PAO1 mutante derivada <i>pqsE</i> :: $\Omega$ , Gm <sup>R</sup>	Este estudio
PAO1 $\Delta$ <i>rhIR</i>	PAO1 mutante derivada <i>rhIR</i> :: $\Omega$ , Sm <sup>R</sup> .	(45)
PAO1 $\Delta$ <i>rhII</i>	PAO1 mutante derivada <i>rhII</i> :: $\Omega$ , Apra <sup>R</sup> .	
ATCC 9027	Aislada de una infección de oído externo.	ATCC
ATCC 9027 $\Delta$ <i>pqsE</i> :: $\Omega$ Gm	ATCC 9027 mutante derivada <i>pqsE</i> :: $\Omega$ , Gm <sup>R</sup> .	Este estudio
PW6882	PAO1 con <i>rhIR</i> :: <i>Tn9lacZ</i> insertado en fase en el gen <i>rhIR</i>	(95)
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	$\phi$ 80 $\Delta$ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ [ <i>lacZYA-argF</i> ]U169 <i>endA recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44</i>	Invitrogen

Plásmidos		
pUCP20	Vector de clonación; <i>plac</i> Cb <sup>R</sup> capaz de replicarse en <i>P. aeruginosa</i> y <i>E.coli</i>	(96)
pUCP24	Vector de clonación; <i>plac</i> Gm <sup>R</sup> capaz de replicarse en <i>P. aeruginosa</i> y <i>E.coli</i>	(91)
pMP220	Derivado de pTJS75, contiene el gen <i>lacZ</i> de <i>E.coli</i> clonado sin el promotor <i>lac</i> , pero con el sitio de unión al ribosoma. Tiene el sitio de clonación proveniente del plásmido pIC20H. Este plásmido es utilizado para construir fusiones transcripcionales, Tet <sup>R</sup>	(92)
pMP220-P <i>phzA1</i>	pMP220 con el promotor P <i>phzA1</i> fusionado a <i>lacZ</i> , Tet <sup>R</sup>	(97)
pJET2.1 blunt	Vector de clonación	Thermo Scientific
pJET-ATE	pJET 2.1 con el fragmento de 1.8 kb de <i>pqsE</i> de la cepa ATCC 9027, Cb <sup>R</sup>	Este estudio
pJET-ATEGM	pJET-ATE con el fragmento de 2.7 kb de <i>pqsE</i> de la cepa ATCC 9027 interrumpido por el cassette de resistencia a gentamicina, Cb <sup>R</sup>	Este estudio
pUCP20- <i>pqsE</i>	Gen <i>pqsE</i> de la cepa PAO1, clonado en el vector pUCP20 ( <i>plac-pqsE-his6</i> ), Cb <sup>R</sup>	Este estudio
pUCP24- <i>pqsE</i>	Gen <i>pqsE</i> de la cepa PAO1, clonado en el vector pUCO24 ( <i>plac-pqsE</i> ), Gm <sup>R</sup>	Este estudio
pUCP24- <i>pqsR</i>	Gen <i>pqsR</i> de la cepa PAO1, clonado en el vector pUCP24 ( <i>plac-pqsR</i> ), Gm <sup>R</sup>	Este estudio
pUCP20- <i>pqsR</i>	Gen <i>pqsR</i> de la cepa PAO1, clonado en el vector pUCP20 ( <i>plac-pqsR</i> ), Cb <sup>R</sup>	Este estudio
pJMG1	Gen <i>rhIR</i> de PAO1, clonado en el vector pUCP24 ( <i>plac-rhIR</i> ), Gm <sup>R</sup>	(59)
pGMYC	Gen <i>rhIR</i> de PAO1, clonado en el vector pUCP20 ( <i>plac-rhIR</i> ), Cb <sup>R</sup>	(96)
pGMYC- <i>pqsE</i>	pGMYC con el gen <i>pqsE</i> de la cepa PAO1, Cb <sup>R</sup>	Este estudio
pIJ773	Fuente del cassette de apramicina.	(77)
pIJ778	Fuente del cassette de estreptomycinina.	(77)

pEX18::Gm	Gm <sup>R</sup> ; <i>oriT</i> <sup>+</sup> <i>sacB</i> <sup>+</sup> , vector para el remplazo de genes con MCS del pUC18.	(78)
pEX18::Sm	Sm <sup>R</sup> ; <i>oriT</i> <sup>+</sup> <i>sacB</i> <sup>+</sup> , vector para el remplazo de genes con MCS del pUC18.	Este estudio
pEX- <i>pqsR</i> ::Apra	pEX18-Sm <sup>R</sup> con 2.4 kb de <i>pqsR</i> de la cepa PAO1 interrumpido con el gen que confiere resistencia a apramicina.	Este estudio
pEX- <i>pqsE</i> ::Gm	pEX18::Sm <sup>R</sup> con 1.9 kb de <i>pqsE</i> de la cepa PAO1 interrumpido con el gen que confiere resistencia a gentamicina.	Este estudio
pEX18AT- <i>pqsE</i> ::ΩGm	pEX18-Sm <sup>R</sup> con 2.7 kb de <i>pqsE</i> de la cepa ATCC 9027 interrumpido con el gen que confiere resistencia a gentamicina.	Este estudio

Abreviatura de los antibióticos: Tet<sup>R</sup>:Tetraciclina, Apra<sup>R</sup>: Apramicina, Gm<sup>R</sup>:Gentamicina, Cb<sup>R</sup>: Carbenicilina, Sm<sup>R</sup>:Estreptomicina.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados para construir los plásmidos listados en la tabla 3.

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Sitio de restricción
pqsRFW	ATAGAATTCATGCCTATTCATAACCTGAAT	<i>EcoR1</i>
pqsRRV	ATACCCGGGCTACTCTGGTGCGGCGCGCTG	<i>SmaI</i>
pqsEFW	TAGGATCCAGCGGGTGCTGGTCCTGA	<i>BamHI</i>
pqsERV	CCAAGCTTGGATGTCCCGTCTCAGTC	<i>HindIII</i>
pqsERVHis	CCCAAGCTTGGGTCAGTGGTGGTGGTGGTGG TGGTCCAGAGGCAGCGCCTGG	<i>HindIII</i>
RTpqsEATFW	GATGCCGAATTGGTCTGGG	-

RTpqsEATRV	GTAGGGCAACAGGCCGC	-
RTpqsEPAFW	TTGAGGCTTTTCGGCTCCC	-
RTpqsEPARV	CAAACCAATTCGGCATCCC	-
RTrpqsLFW	CAAACCAATTCGGCATCCC	-
RTrpqsLFW	ATACACCACCACGCCGAAA	-
RTrpqsLRv	TTCACCACCGATGTACGAGG	-
F-Gm	CAGAAGTAAGTTGGCCGCAGT	-
R-Gm	CGAATTGACATAAGCCTGTTC	-
pqsE up	GAAGAAGCTTTACTTCGACCTGCTGATGACC	<i>HindIII</i>
pqsE 5Aa	CAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTACAGCGCCG CGCCCCAG	-
pqsE 3Aa	GAACAGGCTTATGTCAATTCGGCGTCGACTTC CTGCCCCGGCG	-
pqsE down	AGACAAGCTTTGGGGGAAGCGCCAGTGCAGG	<i>HindIII</i>
pqsEUPHind	AGACAAGCTTTGGGGGAAGCGCCAGTGCAGG	<i>HindIII</i>
rhIR-FT-FW	CCGGAATTCGAGCCTTGCTGCCATCGT	<i>EcoRI</i>
rhIR-FT-RV	CGCGGATCCAAAAAGCCTCCGTCATTCT	<i>BamHI</i>
pqsR up	TACAAAAAAGCAGGCTCCGGTAAATATCCGGA TTTTTC	-
pqsR 5Aa	GTCGACGGATCCCCGGAATAGACCTTGTAGCC GTCCCGAC	-
pqsR 3Aa	GAAGCAGCTCCAGCCTACAGACACCAAGGTGT ATTGCTAC	-

pqsR down	TACAAGAAAGCTGGGTCCTGCGTTTCGATCAG CGTC	-
F-Apr	TATTCCGGGGATCCGTCGAC	-
R-Apr	TGTAGGCTGGAGCTGCTTC	-
attB1-Hd3	CCCAAGCTTGGGGACAAGTTTGTACAAAAAAG CAGGCT	<i>HindIII</i>
attB2-Hd3	CCCAAGCTTGGGGACCACTTTGTACAAGAAAG CTGGGT	<i>HindIII</i>

## 9.2. Alineamientos y esquemas.

```

Y82 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
PB368 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
39016 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
Isolate_TSB 8 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
HM293 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
C7 (T3583) MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
PAO1 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
6077 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
JB2 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
ATCC9027 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
CR1 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
WH-SGI-V-07165 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
CLJ3 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
AR441 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
CLJ1 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
WH-SGI-V-07370 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
WH-SGI-V-07618 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
PA7 MALVDGFLELERSSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAW 60
*****

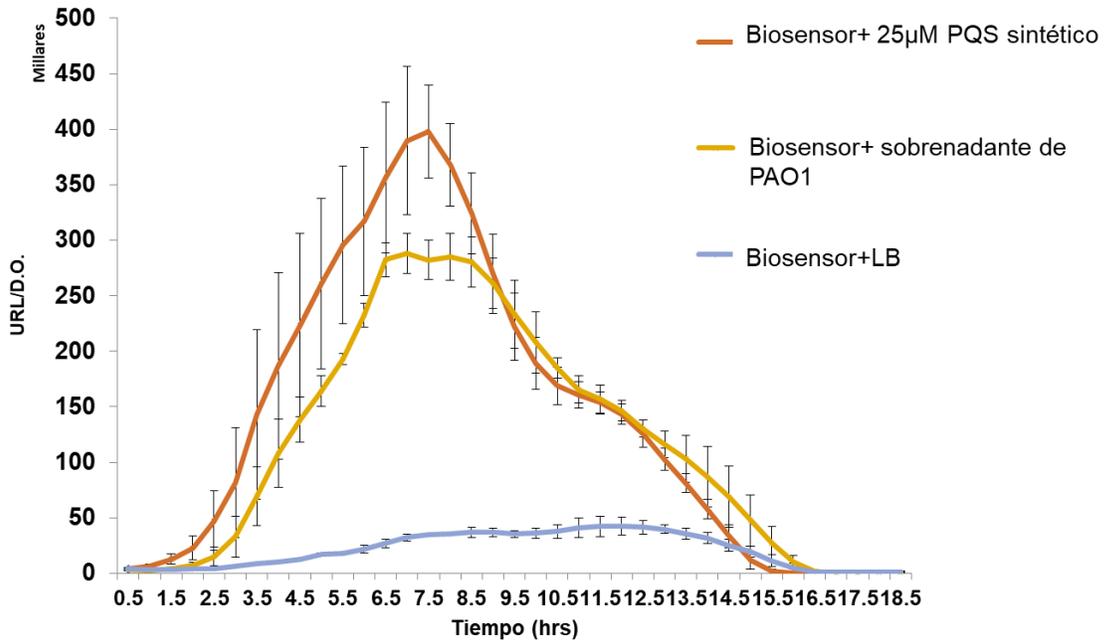
Y82 REHYDRAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
PB368 REHYDRAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
39016 REHYDRAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
Isolate_TSB 8 REHYDRAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
HM293 REHYDRAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
C7 (T3583) REHYDRAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
PAO1 REHYDRAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
6077 REHYDRAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
JB2 REHYDRAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
ATCC9027 REHYDKAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
CR1 REHYDKAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
WH-SGI-V-07165 REHYDKAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
CLJ3 REHYDKAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
AR441 REHYDKAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
CLJ1 REHYDKAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
WH-SGI-V-07370 REHYDKAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
WH-SGI-V-07618 REHYDKAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
PA7 REHYDKAGYARVDPTVSHCTQSVLPIFWEPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYGLTMPLHG 120
*****.*****.*****

```

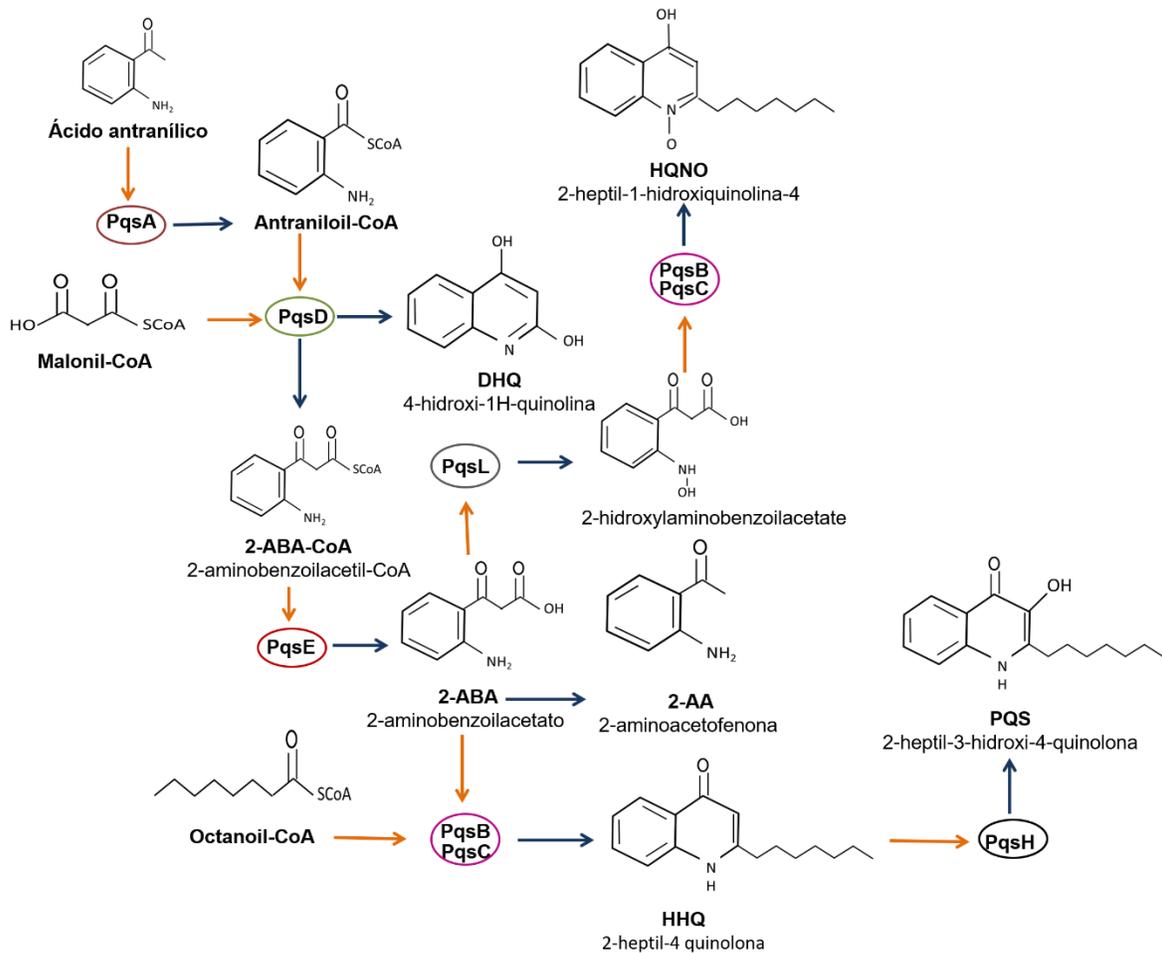
Figura. 24. Alineamiento de la secuencia completa de aminoácidos de LasR.

Y82	ARGELGALSLSVEAENRAEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
PB368	ARGELGALSLSVEAENRAEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
39016	ARGELGALSLSVEAENRAEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
Isolate_TSB 8	ARGELGALSLSVEAENRAEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
HM293	ARGELGALSLSVEAENRAEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
C7 (T3583)	ARGELGALSLSVEAENRAEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
<b>PAO1</b>	ARGELGALSLSVEAENRAEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
6077	ARGELGALSLSVEAENRAEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
JB2	ARGELGALSLSVEAENRAEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
<b>ATCC9027</b>	ARGELGALSLSVEAESRVEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
<b>CR1</b>	ARGELGALSLSVEAESRVEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
WH-SGI-V-07165	ARGELGALSLSVEAESRVEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
CLJ3	ARGELGALSLSVEAESRVEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
AR441	ARGELGALSLSVEAESRVEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
<b>CLJ1</b>	ARGELGALSLSVEAESRVEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
WH-SGI-V-07370	ARGELGALSLSVEAESRAEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
WH-SGI-V-07618	ARGELGALSLSVEAESRAEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
<b>PA7</b>	ARGELGALSLSVEAESRAEANRFMESVLP	TLWMLKD	YALQSGAGLAFEHPVSKPVVLT	SR	180
	***** . * . ***** . *****				
Y82	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
PB368	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
39016	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
Isolate_TSB 8	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
HM293	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
C7 (T3583)	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
<b>PAO1</b>	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
6077	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
JB2	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
<b>ATCC9027</b>	EKEVLQWCAIGKTSWDISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
<b>CR1</b>	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
WH-SGI-V-07165	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
CLJ3	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
AR441	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
<b>CLJ1</b>	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
WH-SGI-V-07370	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
WH-SGI-V-07618	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
<b>PA7</b>	EKEVLQWCAIGKTSWEISVICNCSEANVNFHMGNI	RRKFGVTS	RRVAAIMAVNLGLITL		239
	***** : ***** . ***** : ***** . *****				

Continuación de la figura 24.



**Figura. 25 Cuantificación de PQS utilizando el biosensor PAO1 $\Delta$ pqsA/miniCTX::*PpqsA*'*luxCDABE*.** Actividad del biosensor PAO1 $\Delta$ pqsA/miniCTX::*PpqsA*'*luxCDABE* cultivada con el sobrenadante de la cepa PAO1 o con 25µM de PQS sintético (Sigma-Aldrich).



**Figura. 26** Esquema de la síntesis del AI PQS de *P.aeruginosa*. Figura modificada de García-Reyes et al.2019.

### 9.3. Resultados obtenidos durante la estancia de investigación.

Durante el doctorado realicé una estancia de investigación en el departamento de pediatría de la escuela de medicina en Emory University, Atlanta, Georgia, USA. Bajo la tutela de la Dra. Joanna B. Goldberg.

Objetivo de la estancia fue estudiar el efecto de la sobreexpresión del regulador maestro Vfr y del adenilato ciclasa CyaB en la virulencia de la cepa *P. aeruginosa* PA7.

Las cepas de *P. aeruginosa* que pertenecen al clado PA7, poseen el operón *exlBA*, que codifica para la exolisina ExlA y su transportador ExlB. ExlA es responsable de

la permear las membranas celulares del organismo hésped (98). La transcripción de *exlAB* está regulado de manera positiva por la proteína VfR unido a cAMP.

Previamente se reportó que expresión de *exlBA* disminuye en una mutante *vfR* y que se sobreexpresa en la cepa silvestre cuando se incrementa la concentración de cAMP por la sobreexpresión de *cyaB* (98).

Se sabe, que la cepa de referencia PA7 es mutante *vfR* y por lo tanto presenta una reducida citotoxicidad en células A549, la síntesis de ExlA y la citotoxicidad se restauran al complementar a la cepa con VfR de la cepa de referencia (98), sin embargo, se han reportado otros aislados que pertenecen al clado PA7 capaces de sintetizar ExlA con una VfR funcional.

La cepa de estudio *P. aeruginosa* ATCC 9027 que pertenece al clado de la cepa PA7 no es virulenta en modelo de ratón (59). Aunque se ha reportado que sintetiza VfR (98) y la exolisina ExlA (60). Una hipótesis es que la cantidad de VfR o AMPc estén limitando la virulencia de la cepa ATCC 9027.

Por lo antes mencionado, durante la estancia de investigación, se estudió el efecto de la sobreexpresión de *vfR* y *cyaB*, en la virulencia de la cepa ATCC 9027 en el modelo de ratón y *G. mellonella*, obteniendo los siguientes resultados.

### **9.3.1. Metodología**

#### **9.3.1.1 Construcción de plásmidos para sobreexpresar *cyaB* y *vfR*.**

Los genes *cyaB* y *vfR* se clonaron en el plásmido pUCP24 bajo el control del promotor *lac* y se sobreexpresaron.

Para construir el plásmido pUCP24-*cyaB*, se amplificó *cyaB* de la cepa PAO1 con los oligonucleótidos:

- *cyaB*FWKpnl(Foward):AATCCGGTACCCTCTCCAGCGCATGAAGCC
- *cyaB*RVHindIII (Reverso): AATCCAAGCTTGCGGAGGAGTTCCTGG

El fragmento de 1511 pares de bases fue digerido con las enzimas de restricción *KpnI* y *HindIII* y clonado en el plásmido pUCP24 en los mismos sitios de restricción.

Para construir el plásmido pUCP24-*vfR*, se amplificó *vfR* de la cepa PAO1 con los oligonucleótidos:

- VfrFw*EcoRI* (Foward): GGAATTCCTCGCCGAGGAACATCGCCTC
- VfrRv*HindIII* (Reverso): CCCAAGCTTGGGATCCTGACTGATCCGCGCTG

El fragmento de 1055 pares de bases fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII* y clonado en el plásmido pUCP24 en los mismos sitios de restricción.

Posteriormente, se transformó a la cepa de estudio mediante la técnica de electroporación.

#### **9.3.1.2. Cuantificación de factores de virulencia.**

La cuantificación de piocianina se realizó como se ha reportado en la sección 6.3.5 de esta tesis.

La elastasa LasB, se cuantificó de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 6.2.2.1 de esta tesis, utilizando el reactivo elastina-Congo Red (Sigma Aldrich) (66).

La identificación de proteasas totales se realizó cultivando las cepas previamente en medio LB durante 16h en agitación a 37°C, posteriormente se estandarizó 1 mL de cultivo a una D.O de 1. 1µL de cada cepa fue inoculado en cajas de Petri con agar leche descremada, y cultivado a 37°C por 16 horas. Los halos alrededor del crecimiento bacteriano fueron medidos con un bernier.

La determinación de la actividad hemolítica se realizó estandarizando 1 mL de cada cultivo a una D.O<sub>600</sub> de 1. 1µL de cada cepa fue inoculado en cajas de Petri con sangre de oveja y cultivado durante 24 horas a 37°C.

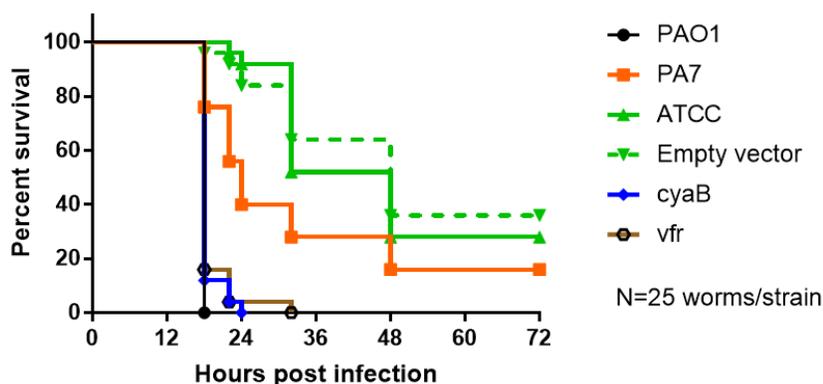
#### **9.3.1.3. Ensayo de virulencia en *G.mellonella* y ratón.**

Para los ensayos de virulencia en el modelo de *G.mellonella* se inyectaron a las larvas con cada cepa de *P. aeruginosa* utilizando la dosis 1x10<sup>2</sup> UFC por gusano. Los ensayos de virulencia en ratón BALB/cAnNHsd de 6–8 semanas de edad, se realizaron utilizando la dosis 5x10<sup>8</sup> UFC, para el modelo de infección intraperitoneal y 5x10<sup>6</sup> UFC, para el modelo de infección intratraqueal.

### 9.3.2. Resultados.

#### 9.3.2.1. Ensayo de virulencia en *G.mellonella*.

Para probar la hipótesis de que los niveles de adenilato ciclasa *cyaB* y VfR son los responsables de la falta de virulencia previamente reportados en la cepa ATCC 9027, se sobreexpresó al gen *cyaB* y *vfr* en la cepa de estudio. Posteriormente, se realizó un ensayo de virulencia en *G. mellonella* para determinar si se restaura la virulencia de la cepa.



**Figura. 27. Supervivencia de *G. mellonella* después de la infección por *P. aeruginosa*.**

De acuerdo con la hipótesis, la sobreexpresión de *vfr* y *cyaB* incrementan la virulencia de la cepa ATCC 9027 en *G.mellonella* (Fig. 27), a niveles similares con la cepa de referencia PAO1, mientras que la cepa silvestre ATCC 9027 y PA7 son menos virulentas en este modelo de infección. Se puede observar prácticamente el mismo nivel de virulencia de la cepa ATCC 9027 sobreexpresado *cyaB* y *vfr*, lo que sugieren que ambas proteínas están relacionadas.

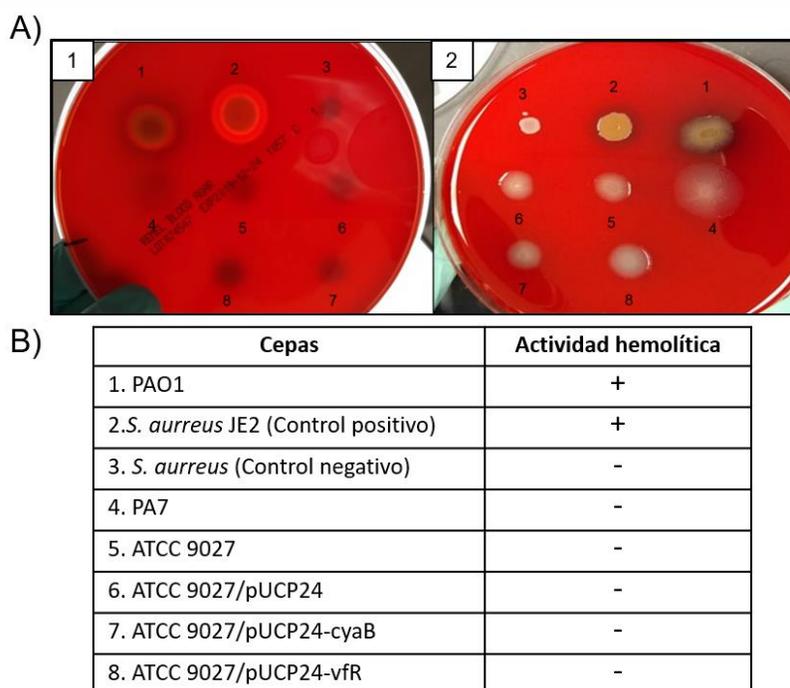
Se ha reportado que cuanto más AMPc se sintetiza con la sobreexpresión de *cyaB*, se mejora la actividad de VfR debido a que VfR unido a AMPc puede unirse a su propio promotor y regular de manera positiva su síntesis (99).

Se espera que la síntesis de la toxina ExIA en las cepas ATCC 9027/pUCP24-*vfr* y ATCC 9027/pUCP24-*cyaB* se encuentre incrementada, ya que la expresión de este factor de virulencia depende de ambas proteínas y que dicha síntesis sea la razón por la cual ahora la cepa ATCC 9027 sea virulenta (98).

### 9.3.2.2. Detección de la síntesis de ExIA.

Elsen et al. reportaron en el sobrenadante de la cepa *P. aeruginosa* CLJ1, que pertenece al clado PA7, la presencia de la exolisina ExIA, la cual describieron como una toxina que pertenece a la familia de la hemolisina/hemaglutinina capaz de perforar la membrana celular y provocar hemorragias (61).

Con el objetivo de estudiar la síntesis de ExIA en la cepa ATCC 9027 sobreexpresando *vfR* y *cyaB* se realizó un ensayo de la actividad hemolítica en cajas Petri con agar sangre.



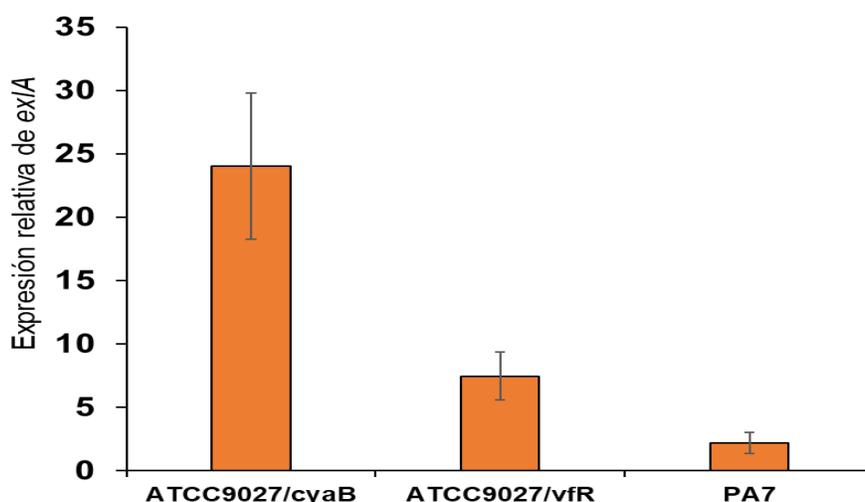
**Figura. 28. Determinación de la actividad hemolítica en placas de agar sangre.**

**A)** Fig. 1: Actividad hemolítica; Fig. 2: Crecimiento. Orden de las cepas en la placa: 1. PAO1; 2. *S. aureus* JE2 (Control positivo de actividad hemolítica); 3. *S. aureus* (aislado no hemolítico); 4. PA7; 5. ATCC 9027; 6. ATCC 9027/pUCP24; 7. ATCC 9027/*cyaB*; 8. ATCC 9027/*vfR*. Los resultados son de al menos tres experimentos independientes.

La presencia de actividad hemolítica no fue observado en la cepa ATCC 9027, aunque ya se reportó que sintetiza la ExIA y que esta toxina tiene actividad hemolítica (61), tampoco se observa actividad cuando sobreexpresa *vfR* o *cyaB*, estos resultados concuerdan los Rebound et al, quien reportó que ExIA no contribuye de manera importante a la lisis de eritrocitos (60) esto explicaría la

usencia de actividad hemolítica observada en este experimento, por lo que no se descartó la producción de exolisina ExIA en las cepas de estudio.

Otra forma de comprobar si *exIA* se está expresando en la cepa ATCC 9027/pUCP24-*vfR* y ATCC 9027/pUCP24-*cyaB*, es mediante un ensayo de RT-qPCR, para ello se sintetizaron los oligonucleótidos para detectar el ARNm de *exIA* reportados por Berry et al. (98); obteniendo los siguientes resultados.



**Figura. 29. Análisis de la expresión relativa de *exIA* por RT-qPCR de la cepa ATCC 9027 sobreexpresando *cyaB* y *vfR* con respecto a la cepa ATCC 9027. El gen *rpoD* fue utilizado como control interno.**

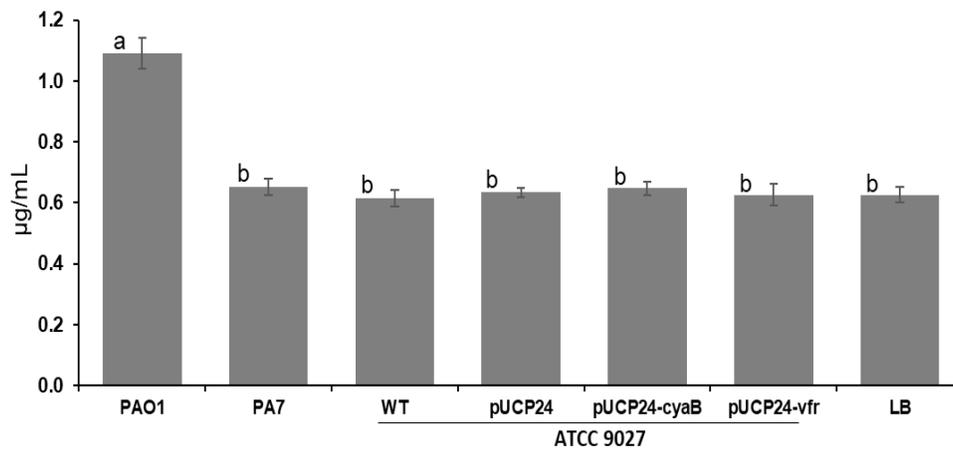
Como se observa en la figura 27, las proteínas VrR y CyaB en la cepa ATCC 9027, regulan de manera positiva la expresión de *exIA*, esto concuerda con lo reportado previamente (98). También se observa que la cepa PA7 sintetiza ExIA a niveles basales, aunque la presencia de esta toxina en esta cepa no aporta a su virulencia(98).

Adicionalmente, se sabe que la proteína Vfr unido a AMPc, regula de manera positiva la síntesis de LasR, que se encuentra en la cima de la cascada de regulación del sistema de DQ de *P. aeruginosa* (99). Esta bacteria regula la síntesis de FV como ELA y PIO mediante el sistema de DQ (12, 13).

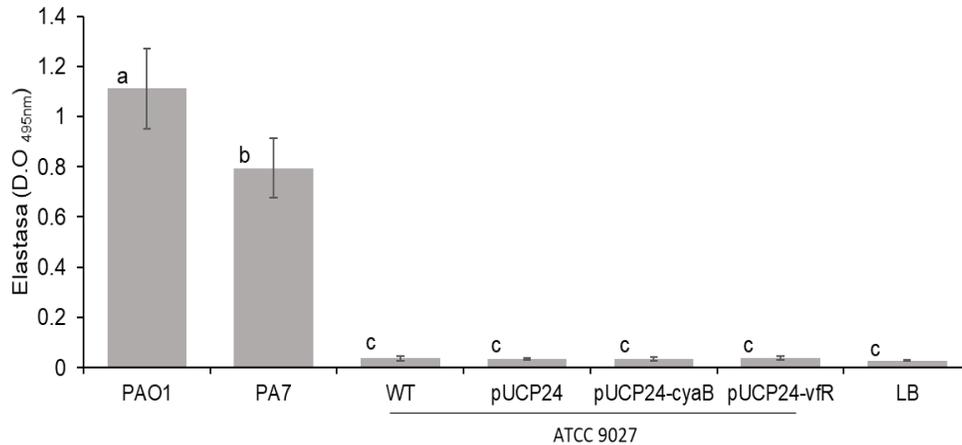
Para determinar la contribución del sistema de DQ en la virulencia de la cepa ATCC 9027 que sobreexpresa *vfr* y *cyaB* se cuantificó la síntesis de PIO y ELA en las cepas cultivadas en medio LB.

### 9.3.2.3. Determinación de la síntesis de pirocianina, elastasa y proteasas totales.

La sobreexpresión de *cyaB* y *vfr*, no restauró en la cepa ATCC 9027 la síntesis de PIO ni ELA en medio LB (Fig. 28 y 29), la falta de una proteína LasR no funcional en la cepa podría explicar este resultado (100) debido a que bajo esta condición de cultivo, la síntesis de ELA y PIO, este último que depende del sistema Rhl, dependen del sistema Las(42).



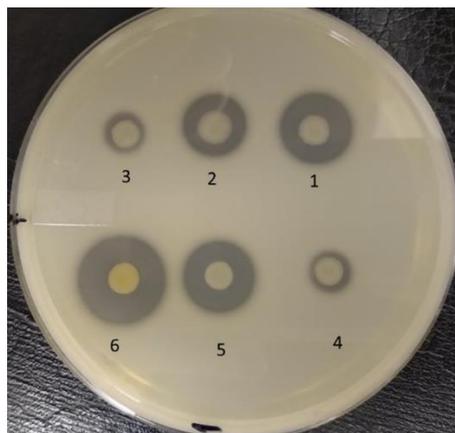
**Figura. 30. Síntesis de PIO en medio LB.** Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras.



**Figura. 31. Cuantificación de la actividad elastolítica en medio LB.** Los datos fueron analizados por la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ); letras diferentes indican diferencias significativas entre las medias; letras iguales significan que no existen diferencias entre las medias de las muestras.

Los resultados obtenidos (Fig. 30 y 21) sugieren que el mecanismo de virulencia de la cepa ATCC 9027/pUCP24-*vfR* y ATCC 9027/pUCP24-*cyaB* observados en el modelo de infección de *G. mellonella* no dependen de PIO ni ELA.

Otro FV que depende de *VfR* en *P. aeruginosa* PAO1 es la síntesis de proteasas totales (101). Adicional a la síntesis de la toxina ExIA en la cepa ATCC 9027 que sobreexpresan *vfR* y *cyaB* (Fig.29), se determinó la síntesis de proteasas totales para tener conocimiento de los FV que se pudieran estar expresando en la cepa en esta condición.

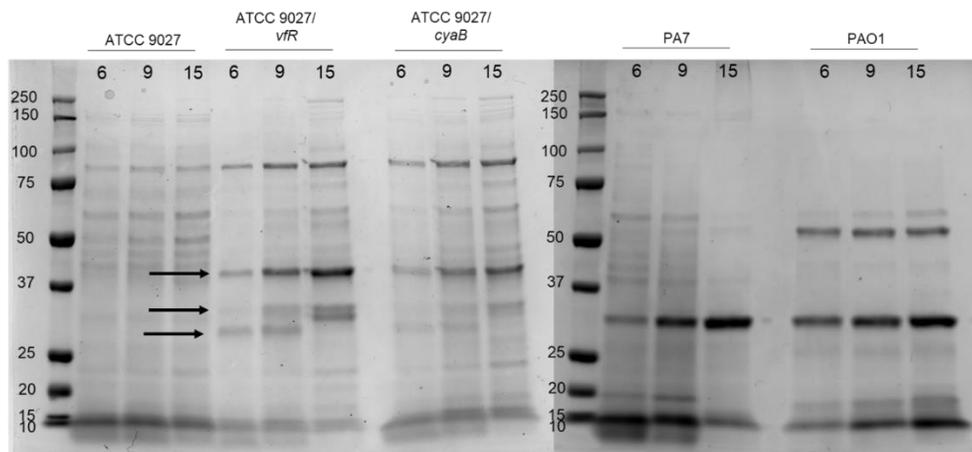


**Figura. 32. Detección de proteasas totales en agar con leche descremada.** Orden de las muestras: 1. PAO1; 2. PA7; 3. ATCC 9027; 4. ATCC 9027/pUCP24; 5. ATCC 9027/pUCP24-*cyaB*; 6. ATCC 9027/pUCP24-*vfR*.

La sobreexpresión de Vfr y CyaB (Fig.32) causó la sobreproducción de proteasas totales en la cepa ATCC 9027, el halo obtenido por la degradación de la caseína en el agar de leche, es mayor en la cepa que sobreexpresa *vfr* que con *cyaB*, esto puede deberse, a que la producción de este FV depende directamente de Vfr (101). La cantidad de Vfr sintetizado por la cepa ATCC 9027 silvestre, limita la síntesis de proteasas totales cuando se sobreexpresa *cyaB*, ya que en esta condición la cantidad de Vfr es limitante, generando un halo más pequeño. Berry et al, reportaron la existencia de aislados mutantes del T3SS que tienen diferentes niveles de producción de Vfr (98), la baja síntesis de Vfr en la cepa ATCC 9027 silvestre (98) y la falta de una proteína LasR funcional (100) pudieran explicar la virulencia atenuada de la cepa en el modelo de *G. mellonella* (Fig.27).

#### 9.3.2.4. Ensayo preliminar de proteínas secretadas por la cepa ATCC 9027 sobreexpresando *vfr* y *cyaB*.

Para tener una aproximación de las proteínas que están siendo secretadas por la cepa ATCC 9027/pUCP24-*vfr* y ATCC 9027/pUCP24-*cyaB*, se recolectó y concentró una muestra de sobrenadantes. Posteriormente, se separaron los componentes de la muestra en un gel de acrilamida desnaturizante y posteriormente se tiñó con azul de Coomassie.

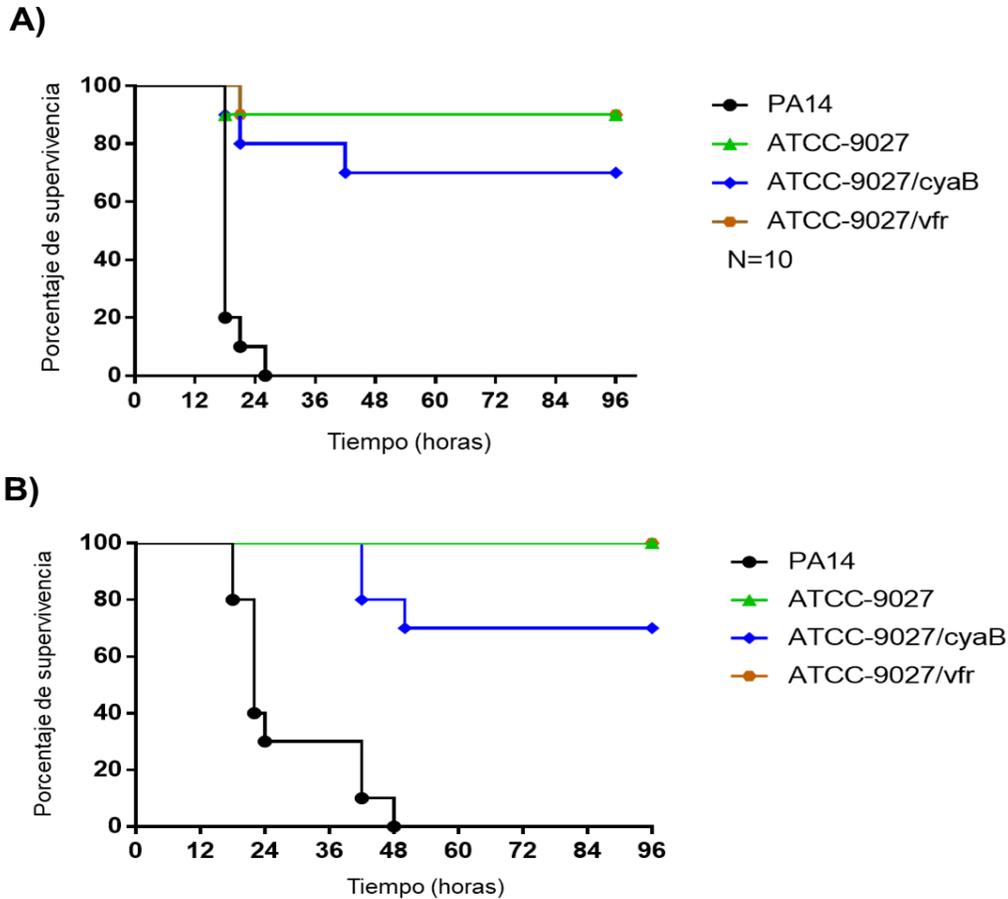


**Figura. 33. Análisis de las proteínas presentes en los sobrenadantes concentrados.** Las muestras se recolectaron a las 6, 9 y 15 horas de cultivo en medio LB.

En la figura 33, se observan 3 proteínas secretadas por la cepa ATCC 9027/pUCP24-*vfR* y ATCC 9027/pUCP24-*cyaB* que no se observa en la cepa silvestre ATCC 9027. También se observa la presencia de una proteína de aproximadamente 90 KDa solo en las cepas de ATCC 9027, ATCC 9027/*vfR* y ATCC9027/*cyaB* que no está presente en la PA7 ni en la PAO1, ¿Corresponde esta proteína a un FV propio de la cepa ATCC 9027? En ensayos previos realizados en el laboratorio de la Dra. Gloria Soberón, se detectó que el sobrenadante de la cepa ATCC 9027 silvestre es capaz de inhibir el crecimiento de la cepa PAO1, aunque se desconoce la razón. ¿Es probable que la cepa ATCC 9027 sea capaz de sintetiza un antibiótico para competir con otras bacterias? Es importante estudiar este fenómeno.

#### **9.3.2.5. Ensayo de virulencia en modelo de ratón.**

Finalmente, se realizó un ensayo de virulencia en ratón, utilizando el modelo de infección intraperitoneal (Fig.34 A) e intratraqueal (Fig.34B). Para este ensayo se utilizó a la cepa *P. aeruginosa* PA14 como control positivo de infección.



**Figura. 34. Ensayo de virulencia en ratón.** A) Infección por inyección intraperitoneal, dosis: PA14:  $4.9 \times 10^8$  UFC/ratón; ATCC 9027:  $4.3 \times 10^8$  CFU/ratón; ATCC9027/*cyaB*:  $5.5 \times 10^8$  CFU/ratón; ATCC 9027/*vfr*:  $5.2 \times 10^8$  CFU/ratón. B) Infección intratraqueal, PA14:  $2.9 \times 10^6$  UFC/ratón; ATCC 9027:  $2.98 \times 10^6$  CFU/ratón; ATCC9027/*cyaB*:  $2.55 \times 10^6$  CFU/ratón; ATCC 9027/*vfr*:  $2.58 \times 10^6$  CFU/ratón.

Como se observa en la figura 32, durante el ensayo de infección por inyección intraperitoneal, las cepas ATCC 9027, ATCC 9027/pUCP24-*cyaB* y ATCC 9027/pUCP24-*vfr* mostraron tener virulencia atenuada con respecto a la cepa PA14, no fueron virulentas. En este modelo de infección, la cepa que sobreexpresó a *cyaB* fue más virulenta, obteniendo el 70% de supervivencia de los ratones, contra el 90% de supervivencia obtenido por la cepa silvestre y cuando sobreexpresa *vfr*.

La cepa ATCC 9027 y ATCC 9027/pUCP24-*vfr* no fueron virulentas en el modelo de infección intratraqueal, en cambio, se obtuvo el 70% de supervivencia de ratones

infectados con la cepa ATCC 9027/pUCP24-*cyaB*, aunque este nivel de virulencia es bajo con respecto al obtenido con la cepa PA14 (Fig.34B).

Cuando la cepa sobreexpresa *cyaB* su virulencia se incrementa, pero aun así sigue siendo una virulencia atenuada con respecto a la cepa PA14. Lo que sigue es que con la sobreexpresión de esa proteína se prende la síntesis de algún FV que afecta a los ratones. La ATCC 9027 por si sola, aunque se sabe que sintetiza ExIA (60). presenta una virulencia atenuada en ratón (Fig.34 A y B).

Se ha reportado que la síntesis del pili tipo IV es importante para la citotoxicidad de ExIA, ya que promueve el contacto entre la bacteria y las células del huésped en *P. aeruginosa* (102). Una hipótesis es que la cepa ATCC 9027 tenga una mutación que le impida expresar las proteínas involucradas en la formación del pili tipo IV, lo que explicaría la falta de virulencia.

Es importante estudiar los mecanismos que pudieran estar involucrados en la síntesis de FV de la cepa ATCC 9027, ya que por su síntesis de RL, observada en medio PPGAS (59) y virulencia atenuada, se convierte en una cepa con potencial para ser utilizada en la industria biotecnológica.

#### **9.4. Artículo de investigación.**

Producto de la investigación que se presenta en esta tesis, se publicó el artículo de investigación:

**García-Reyes S**, Soto-Aceves MP, Cocotl-Yañez M, González-Valdez, Servín-González L, Soberón Chávez G. The outlier *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 9027 harbors a defective LasR quorum-sensing transcriptional regulator. **FEMS Microbiol Lett.** **367(16)**: fnaa122. 2020. **FI: 1.98**. DOI:10.1093/femsle/fnaa122. (Se anexa al final de la tesis)

El artículo que reporta los resultados sobre el efecto de PqsE en la cepa ATCC 9027 y su comparación con lo que sucede en la cepa PAO1 se encuentra en su fase final, falta realizar un experimento de qRT-PCR para determinar la expresión de *pqsE* en

estas cepas, en sus mutantes en *pqsE* y las cepas con plásmidos que sobre expresan a PqsE de la cepa PAO1. Adicionalmente durante mi doctorado se publicaron otros dos artículos de los que también soy coautora y que también se anexan a esta tesis. Estos artículos son:

- **García-Reyes S**, Soberón-Chávez G, Cocotl-Yañez M. The third quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: Pseudomonas quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *J. Med Microbiol* 69: 25-34. 2020. FI: 2.156. DOI: 10.1099.jmmm.0.001116. (Se anexa portada al final de la tesis)
- Martínez-Carranza E, **García-Reyes S**, González-Valdez A, Soberón-Chávez G. Tracking the genome of four *Pseudomonas aeruginosa* isolates that have a defective Las quorum-sensing system but are still virulent. *Access Microbiol.* 2 (7): 1-7. 2020. DOI: 10.1099/acmi.0.000132. (Se anexa portada al final de la tesis)

## 10. Bibliografía.

1. Rutherford ST, Bassler BL. 2012. Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a012427.
2. Nealson KH, Platt T, Hastings JW. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104:313–322.
3. Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A. 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21:1137–1146.
4. Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH. 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179:3127–3132.
5. Luzar MA, Montie TC. 1985. Avirulence and altered physiological properties of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 50:572–576.
6. Murphy TF, Brauer AL, Eschberger K, Lobbins P, Grove L, Cai X. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 177:853–860.
7. Sonmezer MC, Ertem G, Erdinc FS, Kaya Kilic E, Tulek N, Adiloglu A, Hatipoglu C. 2016. Evaluation of risk factors for antibiotic resistance in patients with nosocomial infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2016:1–9.
8. Pachori P, Gothwal R, Gandhi P. 2019. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes Dis* 6:109–119.
9. Hall S, McDermott C, Anoopkumar-Dukie S, McFarland AJ, Forbes A, Perkins A V., Davey AK, Chess-Williams R, Kiefel MJ, Arora D, Grant GD. 2016. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins (Basel)* 8:1–14.
10. Gambello MJ, Iglewski BH. 1991. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol* 173:3000–3009.
11. Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* 179:5756–5767.
12. Granato ET, Harrison F, Kümmerli R, Ross-Gillespie A. 2016. Do bacterial “virulence factors” always increase virulence? A meta-analysis of pyoverdine production in *Pseudomonas aeruginosa* as a test case. *Front Microbiol* 7:1–13.

13. Mukherjee S, Moustafa D, Smith CD, Goldberg JB, Bassler BL. 2017. The RhIR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. *PLoS Pathog* 13:1–25.
14. Pesci EC, Milbank JBJ, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH. 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 96:11229–11234.
15. Pearson JP, Passadori L, Iglewski BH, Greenberg EP. 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 92:1490–1494.
16. Whiteley M, Greenberg EP. 2001. Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J Bacteriol* 183:5529–5534.
17. Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R, Rahme LG. 2001. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci* 98:14613–14618.
18. Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling A, Engstrom E, Coleman JP, Everett C, Ling E a, Pesci EC. 2005. Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187:4372–4380.
19. 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* 69:25–34.
20. Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC, Manoil C. 2002. Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184:6472–6480.
21. Coleman JP, Hudson LL, McKnight SL, Farrow JM, Calfee MW, Lindsey CA, Pesci EC. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* PqsA is an anthranilate-coenzyme A ligase. *J Bacteriol* 190:1247–1255.
22. Schertzer JW, Brown SA, Whiteley M. 2010. Oxygen levels rapidly modulate *Pseudomonas aeruginosa* social behaviours via substrate limitation of PqsH. *Mol Microbiol* 77:1527–1538.
23. Dulcey CE, Dekimpe V, Fauvelle DA, Milot S, Groleau MC, Doucet N, Rahme LG, Lépine F, Déziel E. 2013. The end of an old hypothesis: The *pseudomonas* signaling molecules 4-hydroxy-2-alkylquinolines derive from fatty acids, not 3-ketofatty acids. *Chem Biol* 20:1481–1491.
24. Déziel E, Lépine F, Milot S, He J, Mindrinos MN, Tompkins RG, Rahme LG. 2004. Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1339–1344.

25. Drees SL, Fetzner S, Drees SL, Fetzner S. 2015. PqsE of *Pseudomonas aeruginosa* Acts as Pathway- Specific Thioesterase in the Biosynthesis of Article PqsE of *Pseudomonas aeruginosa* Acts as Pathway-Specific Thioesterase in the Biosynthesis of Alkylquinolone Signaling Molecules. *Chem Biol* 22:611–618.
26. Gonzalez CF, Tchigvintsev A, Brown G, Flick R, Xu X, Osipiuk J, Cuff ME, Lynch S, Savchenko A, Yakunin AF. 2012. Structure and activity of the *Pseudomonas aeruginosa* hotdog- fold thioesterases PA5202 and PA2801. *Biochem J* 444:445–455.
27. Zhang YM, Frank MW, Zhu K, Mayasundari A, Rock CO. 2008. PqsD is responsible for the synthesis of 2,4-dihydroxyquinoline, an extracellular metabolite produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 283:28788–28794.
28. Hennecke U, Fetzner S, Drees SL, Belviso BD, Ernst S, Jagmann N. 2018. PqsL uses reduced flavin to produce 2-hydroxylaminobenzoylacetate, a preferred PqsBC substrate in alkyl quinolone biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 293:9345–9357.
29. Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, Lepine F, Emerson J, McNamara S, Gibson RL, Ramsey BW, Miller SI. 2006. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 103:19890–19895.
30. Kesarwani M, Hazan R, He J, Que YA, Apidianakis Y, Lesic B, Xiao G, Dekimpe V, Milot S, Deziel E, Lépine F, Rahme LG. 2011. A quorum sensing regulated small volatile molecule reduces acute virulence and promotes chronic infection phenotypes. *PLoS Pathog* 7.
31. Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Cámara 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.
32. Brouwer S, Pustelny C, Ritter C, Klinkert B, Narberhaus F, Häussler S. 2014. The PqsR and RhlR transcriptional regulators determine the level of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* by producing two different pqsABCDE mRNA Isoforms. *J Bacteriol* 196:4163–4171.
33. Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* 179:5756–5767.
34. Zhu H, Bandara R, Conibear TCR, Thuruthyil SJ, Rice SA, Kjelleberg S, Givskov M, Willcox MDP. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* with LasI quorum sensing deficiency during corneal infection. *Investig Ophthalmol Vis Sci*

45:1897–1903.

35. Kuang Z, Hao Y, Walling BE, Jeffries JL, Ohman DE, Lau GW. 2011. *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. *PLoS One* 6:e27091.
36. Calfee MW, Coleman JP, Pesci EC. 2001. Interference with *Pseudomonas* quinolone signal synthesis inhibits virulence factor expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11633–7.
37. Farrow JM, Sund ZM, Ellison ML, Wade DS, Coleman JP, Pesci EC. 2008. PqsE functions independently of PqsR-*Pseudomonas* quinolone signal and enhances the rhl quorum-sensing system. *J Bacteriol* 190:7043–7051.
38. Soto-Aceves MP, Cocotl-Yañez M, Merino E, Castillo-Juárez I, Cortés-López H, González-Pedrajo B, Díaz-Guerrero M, Servín-González L, Soberón-Chávez G. 2019. Inactivation of the quorum-sensing transcriptional regulators LasR or RhIR does not suppress the expression of virulence factors and the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 165:425–432.
39. Brint JM, Ohman DE. 1995. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* 177:7155–7163.
40. Anderson RM, Zimprich CA, Rust L. 1999. A second operator is involved in *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) activation. *J Bacteriol* 181:6264–6270.
41. Mavrodi D V, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS. 2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 183:6454–6465.
42. Groleau M, Pereira TDO, Dekimpe V, Déziel E. 2020. PqsE is essential for RhIR-dependent quorum sensing regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *mSystems* 5:e00194-20.
43. Yu S, Jensen V, Seeliger J, Feldmann I, Weber S, Schleicher E, Häussler S, Blankenfeldt W. 2009. Structure elucidation and preliminary assessment of hydrolase activity of PqsE, the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) response protein. *Biochemistry* 48:10298–10307.
44. Feltner JB, Wolter DJ, Pope CE, Groleau M, Smalley NE, Greenberg EP, Mayer-Hamblett N, Burns J, Déziel E, Hoffman LR, Dandekar AA. 2016. LasR variant cystic fibrosis isolates reveal an adaptable quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 7:e01513-16.
45. Morales E, González-Valdez A, Servín-González L, Sobefón-Chavez G. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing response in the absence of functional LasR and LasI proteins: The case of strain 148, a virulent dolphin

isolate. FEMS Microbiol Lett 364:1–10.

46. Gutiérrez-Gómez U, Servín-González L, Soberón-Chávez G. 2019. Role of  $\beta$ -oxidation and de novo fatty acid synthesis in the production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol 102:3753–3760.
47. Roy PH, Tetu SG, Larouche A, Elbourne L, Tremblay S, Ren Q, Dodson R, Harkins D, Shay R, Watkins K, Mahamoud Y, Paulsen IT. 2010. Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. PLoS One 5:e8842.
48. Freschi L, Vincent AT, Jeukens J, Emond-Rheault JG, Kukavica-Ibrulj I, Dupont MJ, Charette SJ, Boyle B, Levesque RC. 2019. The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity. Genome Biol Evol 11:109–120.
49. Lazdunski A, Guzzo J, Filloux A, Bally M, Murgier M. 1990. Secretion of extracellular proteins by *Pseudomonas aeruginosa*. Biochimie 72:147–156.
50. Jyot J, Balloy V, Jouvion G, Verma A, Touqui L, Huerre M, Chignard M, Ramphal R. 2011. Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: In vivo evidence of a significant role in death due to lung infection. J Infect Dis 203:1369–1377.
51. Galdino ACM, Branquinha MH, Santos ALS, Viganor L. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* and its arsenal of proteases: Weapons to battle the host, p. 381–197. In Chakraborti S., DN (ed.), Pathophysiological Aspects of Proteases. Springer, Singapore.
52. Delmotte P, Sanderson MJ. 2006. Ciliary beat frequency is maintained at a maximal rate in the small airways of mouse lung slices. Am J Respir Cell Mol Biol 35:110–117.
53. Lau GW, Hasset DJ, Ran H, Kong F. 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends Mol Med 10:599–606.
54. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev 15:194–222.
55. Meirelles LA, Newman DK. 2018. Both toxic and beneficial effects of pyocyanin contribute to the lifecycle of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 110:995–1010.
56. Zulianello L, Canard C, Köhler T, Caille D, Lacroix JS, Meda P. 2006. Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun 74:3134–3147.
57. Soberón-Chávez G, Lépine F, Déziel E. 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol Biotechnol 68:718–725.

58. Freschi L, Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I, Boyle B, Dupont MJ, Laroche J, Larose S, Maaroufi H, Fothergill JL, Moore M, Winsor GL, Aaron SD, Barbeau J, Bell SC, Burns JL, Camara M, Cantin A, Charette SJ, Dewar K, Déziel É, Grimwood K, Hancock REW, Harrison JJ, Heeb S, Jelsbak L, Jia B, Kenna DT, Kidd TJ, Klockgether J, Lam JS, Lamont IL, Lewenza S, Loman N, Malouin F, Manos J, McArthur AG, McKeown J, Milot J, Naghra H, Nguyen D, Pereira SK, Perron GG, Pirnay JP, Rainey PB, Rousseau S, Santos PM, Stephenson A, Taylor V, Turton JF, Waglechner N, Williams P, Thrane SW, Wright GD, Brinkman FSL, Tucker NP, Tümmler B, Winstanley C, Levesque RC. 2015. Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Front Microbiol* 6:1–8.
59. Grosso-Becerra M-V, González-Valdez A, Granados-Martínez MJ, Morales E, Servín-González L, Méndez JL, Delgado G, Morales-Espinosa R, Ponce-Soto GY, Cocotl-Yañez M, Soberón-Chávez G. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is a non-virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:9995–10004.
60. Reboud E, Elsen S, Bouillot S, Golovkine G, Basso P, Jeannot K, Attrée I, Huber P. 2016. Phenotype and toxicity of the recently discovered *exlA*-positive *Pseudomonas aeruginosa* strains collected worldwide. *Environ Microbiol* 18:3425–3439.
61. Elsen S, Huber P, Bouillot S, Couté Y, Fournier P, Dubois Y, Timsit JF, Maurin M, Attrée I. 2014. A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell Host Microbe* 15:164–176.
62. Xiao G, He J, Rahme LG. 2006. Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* *mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology* 152:1679–1686.
63. Jayal A, Johns BE, Purdy KJ, Maddocks SE. 2017. Draft genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, originally isolated from an outer ear infection. *Genome Announc* 5:e01397-17.
64. Setoodeh P, Jahanmiri A, Eslamloueyan R, Niazi A, Ayatollahi SS, Aram F, Mahmoodi M, Hortamani A. 2014. Statistical screening of medium components for recombinant production of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 rhamnolipids by nonpathogenic cell factory *Pseudomonas putida* KT2440. *Mol Biotechnol* 56:175–191.
65. Zhang Y, Miller RM. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (Biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* 58:3276–3282.
66. Heurlier K, Haenni M, Guy L, Krishnapillai V, Haas D. 2005. Quorum-sensing negative (*lasR*) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* avoid cell lysis and death. *J Bacteriol* 187:4875–4883.

67. Rampioni G, Pustelny C, Fletcher MP, Wright VJ, Bruce M, Rumbaugh KP, Heeb S, Cámara 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 12:1659–1673.
68. Cadoret F, Soscia C, Voulhoux R. 2014. *Pseudomonas* methods and protocols Gene transfer: Transformation/Electroporation, 1st ed. Humana Press, New York, NY, New York.
69. Bains M, Fernández L, Hancock REW. 2012. Phosphate starvation promotes swarming motility and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 78:6762–6768.
70. Hancock REW, Poole K, Benz R. 1982. Outer membrane protein P of *Pseudomonas aeruginosa*: Regulation by phosphate deficiency and formation of small anion-specific channels in lipid bilayer membranes. *J Bacteriol* 150:730–738.
71. Bioprocessing A. 2016. *BD Bionutrients™ Technical Manual*. Yeast.
72. Silva-Rocha R, Martínez-García E, Calles B, Chavarría M, Arce-Rodríguez A, De Las Heras A, Páez-Espino AD, Durante-Rodríguez G, Kim J, Nikel PI, Platero R, De Lorenzo V. 2013. The Standard European Vector Architecture (SEVA): A coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res* 41:666–675.
73. Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL, Levesque RC, Mattick JS. 2002. Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184:3605–3613.
74. Matsuyama T, Sogawa M, Yano I. 1987. Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. *Appl Environ Microbiol* 53:1186–1188.
75. Miller JH. 1992. *Experiments in molecular genetics*. Publ by Cold Spring Harb Lab (Cold Spring Harb Lab NY) 433:352–355.
76. Choi K, Schweizer HP. 2005. An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMC Microbiol* 5:1–11.
77. Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. 2003. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1541–1546.
78. Tung T, Hoang, RoxAnn R, Karkhoff-Schweizer, Alecksandr J, Kutchma HPS. 1998. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation

of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212:77–86.

79. Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP. 1990. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: Interchangeability of the two anthranilate synthase and evolutionary implications. *J Bacteriol* 172:884–900.
80. Mukherjee S, Moustafa DA, Stergioula V, Smith CD, Goldberg JB, Bassler BL. 2018. The PqsE and RhIR proteins are an autoinducer synthase–receptor pair that control virulence and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci* 115:9411–9418.
81. 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* 15:1–14.
82. Qiu H, Li Y, Dai W. 2019. Codon-usage frequency mediated SNPs selection in *lasR* gene of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microbiol Res* 223–225:137–143.
83. Sood U, Singh DN, Hira P, Lee J-K, Kalia VC, Lal R, Shakarad M. 2020. Rapid and solitary production of mono-rhamnolipid biosurfactant and biofilm inhibiting pyocyanin by a taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* strain CR1. *J Biotechnol* 307:98–106.
84. Fukushima J, Ishiwata T, Kurata M, You Z, Okuda K. 1994. Intracellular receptor-type transcription factor, *LasR*, contains a highly conserved amphipathic region which precedes the putative helix-turn-helix DNA binding motif. *Nucleic Acids Res* 22:3706–3707.
85. Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP. 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 96:13904–13909.
86. Croda-García G, Grosso-Becerra V, Gonzalez-Valdez A, Servín-González L, Soberón-Chávez G. 2011. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhIR*: role of the CRP orthologue *Vfr* (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators *LasR* and *RhIR*. *Microbiology* 157:2545–2555.
87. Knoten CA, Wells G, Coleman JP, Pesci EC. 2014. A conserved suppressor mutation in a tryptophan auxotroph results in dysregulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis. *J Bacteriol* 196:2413–2422.
88. Meng X, Ahator S Dela, Zhang L-H. 2020. Molecular mechanisms of phosphate stress activation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems. *mSphere* 5:e00119-20.
89. Rampioni G, Falcone M, Heeb S, Frangipani E, Fletcher MP, Dubern JF, Visca P, Leoni L, Cámara M, Williams P. 2016. Unravelling the genome-wide contributions of specific 2-alkyl-4-quinolones and PqsE to quorum sensing in

- Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog 12:1–25.
90. Holloway BW. 1955. Genetic Recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. J Gen Microbiol 13:572–581.
  91. West SEH, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ. 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene 128:81–86.
  92. Spaink HP, Okker RJH, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg BJJ. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. Plant Mol Biol 9:27–39.
  93. De Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U, Timmis KN. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. J Bacteriol 172:6568–6572.
  94. Diggle SP, Fletcher MP, Cámara M, Williams P. 2011. Quorum Sensing, p. 21–30. In Quorum Sensing: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.
  95. Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, Chun-rong L, Guenther D, Bovee D, Olson M V, Manoil C. 2003. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. PNAS 100:14339–14344.
  96. Medina G, Juárez K, Díaz R, Soberón-Chávez G. 2003. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhIR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. Microbiology 149:3073–3081.
  97. Medellín CMS. 2012. Relación de la actividad transcripcional de los dos operones *phzABCDEFG* y del gen *phzM* con la sobreproducción de piocianina en *Pseudomonas aeruginosa* ID4365. Tesis UNAM.
  98. Berry A, Han K, Trouillon J, Robert-Genthon M, Ragno M, Lory S, Attrée I, Elsen S. 2018. cAMP and Vfr control exolysin expression and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* taxonomic outliers. J Bacteriol 200:1–15.
  99. Fuchs EL, Brutinel ED, Jones AK, Fulcher NB, Urbanowski ML, Yahr TL, Wolfgang MC. 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. J Bacteriol 192:3553–3564.
  100. García-Reyes S, Soto-Aceves MP, Cocotl-Yañez M, González-Valdez A, Servín-González L, Chávez GS. 2020. The outlier *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 9027 harbors a defective LasR quorum-sensing transcriptional regulator. FEMS Microbiol Lett 367:1–8.
  101. West SEH, Sample AK, Runyen-Janecky LJ. 1994. The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production,

belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J Bacteriol* 176:7532–7542.

102. Basso P, Ragno M, Elsen S, Reboud E, Golovkine G, Bouillot S, Huber P, Lory S, Faudry E, Attrée I. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* pore-forming exolysin and type IV pili cooperate to induce host cell lysis. *MBio* 8:1–16.



RESEARCH LETTER – Pathogens &amp; Pathogenicity

# The outlier *Pseudomonas aeruginosa* strain ATCC 9027 harbors a defective LasR quorum-sensing transcriptional regulator

Selene García-Reyes<sup>1</sup>, Martín P. Soto-Aceves<sup>1</sup>, Miguel Cocotl-Yañez<sup>2</sup>, Abigail González-Valdez<sup>1</sup>, Luis Servín-González<sup>1</sup> and Gloria Soberón Chávez<sup>1,\*</sup>,†

<sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apdo. Postal 70228, C. P. 04510, CDMX, México and

<sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C.P. 04510

\*Corresponding author: Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Tercer Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Apdo. Postal 70228, C. P. 04510, CDMX, México. E-mail: [gloria@biomedicas.unam.mx](mailto:gloria@biomedicas.unam.mx)

**One sentence summary:** *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is avirulent and its LasR transcriptional regulator is not functional, this explains why it does not synthesize virulence factors like elastase, rhamnolipids and pyocyanin.

Editor: Kendra Rumbaugh

†Gloria Soberón Chávez, <http://orcid.org/0000-0002-0282-3882>

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* infections represent an important health problem that has been recognized by the World Health Organization as a research priority. A complex regulatory network called the quorum sensing (QS) regulates several *P. aeruginosa* virulence-related traits, including production of elastase, rhamnolipids and pyocyanin. The avirulent *P. aeruginosa* strain ATCC 9027 belongs to clade 3, which is the more distant phylogroup in relationship to the other four clades of this species. This strain does not produce QS-regulated virulence factors such as elastase and rhamnolipids when cultured in rich LB medium. We report here that ATCC 9027 harbors a defective LasR protein, presumably due to the presence of an aspartic acid in position 196 instead of a glutamic acid which is the amino acid present in this position in functional LasR proteins of the type strains PAO1 (clade 1) and PA7 (also belonging to clade 3), among others. In addition, we report that ATCC 9027 and PA7 strains present differences compared to the PAO1 strain in *lasB* which encodes elastase, and in the *rhlR* regulatory sequences that modify *las*-boxes, and that these mutations have a little effect in the expression of these genes by a functional LasR transcriptional regulator.

**Keywords:** PA7 clade; LasR activity; RhlR-expression; quorum-sensing response

## INTRODUCTION

*Pseudomonas aeruginosa* is an environmental bacterium and is also an opportunistic human pathogen (Moradali, Ghods and Rehm 2017). It represents an important health hazard due to its

high intrinsic and acquired antibiotic resistance and its ability to cause serious nosocomial infections and to infect immunocompromised individuals (Driscoll, Brody and Kollef 2007; Gelatly and Hancock 2013). In 2017, the World Health Organization published on its website ([www.who.int](http://www.who.int)) the priority pathogens

Received: 5 May 2020; Accepted: 17 July 2020

© FEMS 2020. All rights reserved. For permissions, please e-mail: [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

list for research and development of new therapeutic strategies, in which carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strains were ranked as a critical priority.

Clinical and environmental *P. aeruginosa* isolates represent a single population and all strains are potential pathogens since genes encoding for virulence-associated traits are part of the core genome of this species (Grosso-Becerra et al. 2014). A total of five phylogenetic *P. aeruginosa* clades have been described and all comprise both clinical and environmental members (Freschi et al. 2015, 2019). The PA7 clade, or clade 3, is the most divergent phylogroup and is therefore considered a taxonomic outlier group (Roy et al. 2010; Freschi et al. 2015, 2019). PAO1 is the type strain of clade 1, and PA14 strain is the reference of clade 2 (Freschi et al. 2015; Sood et al. 2019).

The production of important *P. aeruginosa* virulence-associated traits is regulated at the level of transcription by a complex global regulatory network (Huang et al. 2019) called quorum sensing (QS) that relies in the production of autoinducers (AIs) that interact with transcriptional regulators to activate their production at the early stationary phase (Williams and Cámara 2009). *Pseudomonas aeruginosa* QS has been mainly studied using PAO1 and PA14 strains as models. In these strains, QS regulatory network contains three systems that interact with each other in a hierarchical way, the Las, Rhl and Pqs systems (Lee and Zhang 2014). The LasR transcriptional regulator is at the top of the QS cascade, since, when coupled with the autoinducer (AI) 3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone (3O-C12-HSL) produced by the LasI enzyme, it activates the transcription of genes for some virulence-associated traits like the protease elastase (ELA; encoded by the *lasB* gene) and of the gene encoding LasI. LasR/3O-C12-HSL also activates transcription of the *rhlR* gene, which encodes another QS-transcriptional regulator (Pesci et al. 1997) and of *rhlI* that encodes the enzyme that produces the AI butanoyl-homoserine lactone (C4-HSL; Pesci et al. 1997; Morales et al. 2017). RhlR/C4-HSL in turn activates transcription of the *rhlAB* operon that encodes the enzymes involved in rhamnolipid (RL) production, and of the *phz* genes and operons that encode enzymes that participate in the synthesis of the phenazine pyocyanin (PYO; Higgins et al. 2018). The third QS system called Pqs acts mainly through the modulation of RhlR activity; it is dependent on the alkyl quinolones (AQs) 2-heptyl-3, 4-dihydroxyquinoline (PQS) and its precursor 4-hydroxy-2-heptylquinoline (HHQ) as AIs that interact with the transcriptional regulator PqsR (García-Reyes, Soberón-Chávez and Cocotl-Yanez 2020). LasR/3O-C12-HSL activates the Pqs system through the activation of *pqsR* and also of the gene encoding PqsH, the enzyme that converts HHQ to PQS (García-Reyes, Soberón-Chávez and Cocotl-Yanez 2020).

The protease ELA plays an important role in *P. aeruginosa* infections (Van Der Plas et al. 2016) and its QS-dependent synthesis is tightly controlled. The *lasB* gene contains two *las*-boxes (OP1 and OP2) where LasR/3O-C12-HSL and/or RhlR/C4-HSL can interact. Both transcriptional regulators coupled with their AIs are involved in the activation of this gene (Brint and Ohman 1995; Anderson, Zimprich and Rust 1999; Soto-Aceves et al. 2019).

QS-proficient LasR mutants are very frequently isolated from patients (Feltner et al. 2016; Qiu, Li and Dai 2019), and it is until recently that the mechanism of LasR dispensability has started to be elucidated (Morales et al. 2017; Chen et al. 2019; Kostylev et al. 2019; Cruz et al. 2020). The study of the molecular mechanisms involved in LasR-independent RhlR expression that is found in strains with an atypical QS response, is a matter of great importance since they will escape from anti-virulence therapeutic strategies based on LasR inhibition (Abelyan, Grabski and Tiratsuyan 2020).

The QS response in strains belonging to the PA7 clade has not been thoroughly studied, so it is not known how their production of PYO, ELA and RL is regulated. Genomic analysis of strains belonging to this divergent phylogroup showed some peculiarities of the genes involved in virulence. For example, they lack genes encoding for the type III secretion system (T3SS), and also lack *rhlC* that encodes the enzyme that converts RL with one rhamnose moiety (mono-RL) to RL with two rhamnosides (di-RL; Freschi et al. 2019). In addition, it has been reported that the production of a hemolysin encoded by the *exlBA* operon is the key virulence associated trait for strains belonging to clade 3 and that this hemolysin is only present in strains that lack T3SS (Reboud et al. 2016; Trouillon et al. 2020). However, it has also been reported, that strain ATCC 9027 (also called DSM1128) which belongs to clade 3 (Reboud et al. 2016; Sood et al. 2019) is avirulent in mouse model (Grosso-Becerra et al. 2016) even though it synthesizes the ExlA hemolysin (Reboud et al. 2016).

The genome sequence of ATCC 9027 has been reported (Mai-Prochnow et al. 2015; Grosso-Becerra et al. 2016) and its QS response has been partially characterized (Grosso-Becerra et al. 2016). It produces low amounts of RL (but no ELA) in the phosphate-limited PPGAS medium (Grosso-Becerra et al. 2016), and is unable to produce these QS-regulated virulence traits in LB medium. RhlR overexpression in ATCC 9027 leads to RL overproduction in PPGAS medium without this strain becoming virulent (Grosso-Becerra et al. 2016).

The aim of this work is to determine whether the LasR transcriptional regulator of the ATCC 9027 strain (A-LasR) is proficient in activating the QS response using the production of ELA and RL as markers of a functional LasR. We show that A-LasR has differences in its amino-acid sequence compared to the PAO1 LasR (P-LasR) and PA7 LasR (P7-LasR). We conclude that the E196D change, which is unique to A-LasR, causes a diminished ability to activate *lasB* and *rhlR* transcription. We also describe changes in the PA7 and ATCC 9027 *lasB* and *rhlR* promoter sequences that modify the reported *las*-boxes (LasR and/or RhlR binding sites) and show that these differences do not modify transcriptional activation of these genes by the P-LasR protein, but in the case of *lasB* this change in the *las*-box sequence seems to slightly increase RhlR binding affinity.

The results shown in this work contribute to the understanding of the *P. aeruginosa* QS response in ATCC 9027, a strain belonging to clade 3, that is a subject of scientific and applied interest, since the production of RL by avirulent *P. aeruginosa* derivatives is a matter of great biotechnological interest (Chong and Li 2017).

## METHODS

Detailed description of methods is provided in Supplementary information.

### Microbiological methods

The strains and plasmids used in this work are shown in supplementary information (Tables S1 and S2, Supporting Information). In all experiments we used MPAO1 strain provided by the University of Washington (Table S1, Supporting Information), but we refer to it as PAO1. The strains were routinely cultured in LB broth (Miller 1992). Cultures were inoculated at an optical density at 600 nm of 0.05 and were incubated with continuous shaking (225 rpm) at 37°C for 16 h.  $\beta$ -galactosidase activity was measured as previously described (Miller 1992).

## Detection of LasR by Western blot

Western blot analysis of LasR was done according to Grosso-Becerra et al. (2014) with certain modifications: 13 µg of total proteins was separated by 0.1% SDS, 12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The Goat anti-rabbit immunoglobulin G (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, USA) secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase was used at a 1:5000 dilution.

## Determination of ELA activity and detection of RL

ELA activity was determined in LB culture supernatants using the elastin–Congo Red protocol (Beatson et al. 2002), using 100 µL of each supernatant and 900 µL elastase buffer (0.1 M Tris-HCl pH 7.2, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) with 5 mg of elastin–Congo Red, shaken (225 rpm) at 37°C for 30 min. The insoluble substrate (unreacted elastin–Congo red) was pelleted by centrifugation (13 000 × g for 10 min) and the absorbance of the supernatant was measured at OD<sub>495nm</sub> with a spectrophotometer.

RL were detected by thin layer chromatography (TLC, Matsuyama, Sogawa and Yano 1987) using 5 mL of culture supernatant extracted with the same volume of chloroform–methanol (2:1); the organic phase was recovered and evaporated with air. A total of 100 µL of methanol was added to the dry tubes and 5 µL of each sample were loaded in a TLC plate (TLC SILICA GEL 60 F254 MERK), which was resolved with a mobile phase consisting of chloroform–methanol–acetic acid (65:15:2) and developed with α-naphthol solution containing: 5 g α-naphthol, 160.5 mL ethanol, 12.6 mL water and 20.5 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, at 80°C. All experiments presented in this work were performed with three biological replicates.

## DNA manipulation

Oligonucleotides used in this work are listed in supplementary information (Table S2, Supporting Information). DNA was purified and manipulated by using standard techniques (Sambrook, Fritsch and Maniatis 1989). All plasmids were routinely maintained in *E. coli* DH5α and were introduced by electroporation into *P. aeruginosa* as described previously (Cadoret, Soscia and Voulhoux 2014).

## Statistical analysis

The statistical analyses were performed using the Origin 2020 software. Analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison analysis test (Tukey) were used to determine the significance of the differences between the means. Probability values lower than α = 0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

### The LasR protein of strain ATCC 9027 (A-LasR) has an amino acid change in position 196 (E196D) that affect its function as a transcriptional activator

Strain ATCC 9027 does not produce QS-regulated virulence traits when cultured in LB medium, suggesting that this strain has a defective Las system. In order to determine whether this transcriptional regulator contains some amino acid changes that reduced its activity, as has been reported for several cystic fibrosis (CF) isolates (Qiu, Li and Dai 2019), we compared the sequence

of this protein with those of PAO1 LasR (P-LasR), PA7 LasR (P7-LasR) and LasR of other 12 *P. aeruginosa* strains (Figure S1, Supporting Information), including two other strains that belong to clade 3, CLJ1 (Elsen et al. 2014) and CR1 (Sood et al. 2019). We found that A-LasR contains five amino acid changes with respect to P-LasR: R66K, N136S, A138V, S172N and E196D (Figure S1, Supporting Information). Only two of those changes, A138V and E196D, are not present in P7-LasR (Figure S1, Supporting Information). LasR of strains CLJ1 and CR1 have the A138V change with respect to P-LasR and P7-LasR, while the E196D change is unique to A-LasR among the 15 LasR sequences analyzed (Figure S1, Supporting Information).

Position 138 forms part of LasR 3OC12-HSL-binding domain and corresponds to one of the ends of α-helix 6. The amino acid in this position is not conserved among different members of the LuxR family of transcriptional regulators. Even though alanine is frequently present in this position, other amino acids like threonine, tyrosine, serine and isoleucine are also found (Qiu, Li and Dai 2019). It is possible that the amino acid variability in position 138 is related to the different nature of the AI that each member of the LuxR family of transcriptional regulators binds. The sequence analysis of LasR of 15 *P. aeruginosa* isolates shows that in position 138 either an alanine (such as P-LasR and P7-LasR) or a valine (A-LasR, and the LasR of CLJ1 and CR1) is present (Figure S1, Supporting Information). The fact that strain CLJ1 is able to produce ELA (Elsen et al. 2014) and that strain CR1 is able to produce mono-RL and PYO (Sood et al. 2020) suggests that their LasR proteins (containing a valine in position 138) are functional, so it is likely that the A138V change in A-LasR does not affect its ability to activate transcription.

LasR position 196 forms part of the helix-turn-helix domain that interacts with DNA (Fukushima et al. 1994), and in all members of LuxR transcriptional regulators is occupied by either glutamic or aspartic acid (Qiu, Li and Dai 2019). Thus, it can be assumed that the function of LasR would not be modified by changing a glutamic for an aspartic acid in this position because this change is conservative, although the helix-turn-helix DNA binding motif between *P. aeruginosa* LasR and orthologs of other closely related organisms have a glutamic acid in position 196 (Chowdhury and Bagchi 2016). Furthermore, ATCC 9027 is the only strain among the 15 *P. aeruginosa* strains analyzed in this work that contains an aspartic acid in position 196 of LasR instead of a glutamic acid (Figure S1, Supporting Information), indicating that glutamic acid in position 196 has a fundamental role in the activity of the LasR protein.

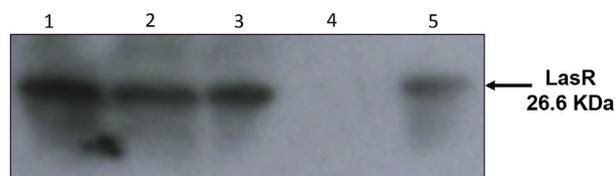
Taking this analysis into account we hypothesized that A-LasR has a decreased ability to activate transcription, caused by the presence of an aspartic acid in position 196.

### ATCC 9027 expresses LasR in LB medium

Another possibility to explain that strain ATCC 9027 does not produce any QS-related trait when cultured in LB medium is that the LasR protein is not expressed in this medium. In order to rule out this possibility, we performed a western blot assay. It is apparent that strain ATCC 9027 expresses LasR at a level similar to the PAO1 strain when cultured in LB medium (Fig. 1). Thus, lack of production of QS-dependent virulence traits in this medium is not due to the absence of LasR.

### A-LasR is a defective transcriptional activator.

To demonstrate that the lack of ATCC 9027 production of QS-related traits in LB medium was due to a non-functional LasR,



**Figure 1.** Detection of LasR by western blot. Lanes correspond to the following strains cultured in LB medium: (1) ATCC 9027/A-LasR, (2) ATCC 9027, (3) PAO1 $\Delta$ lasR/A-LasR, (4) PAO1 $\Delta$ lasR and (5) PAO1. This experiment was repeated twice with similar results.

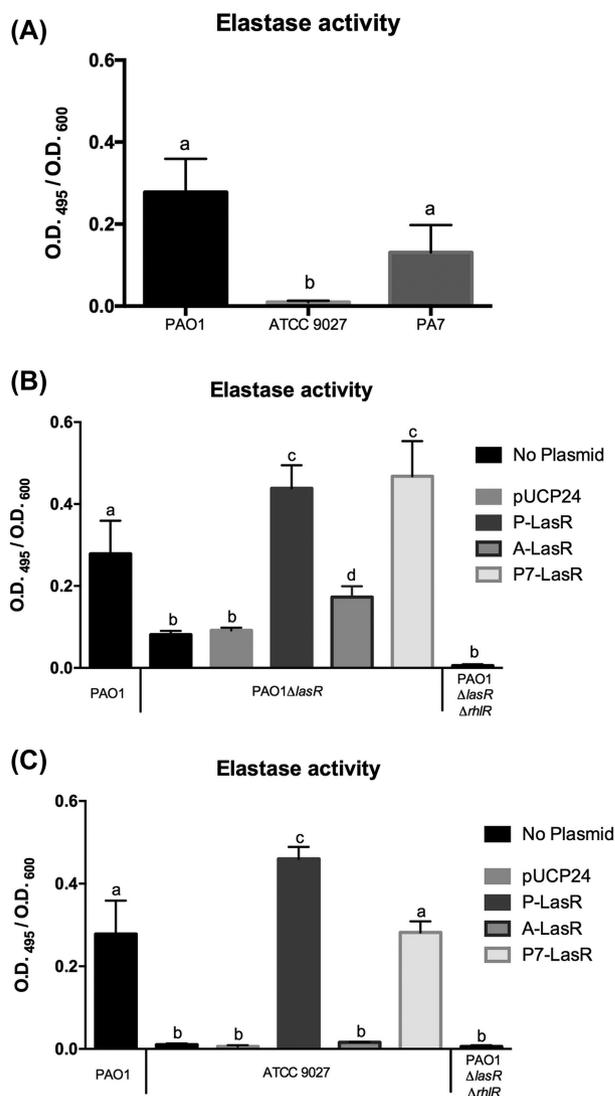
we measured ELA as a marker of its ability to activate transcription, since *lasB* expression is mainly dependent on transcriptional activation by LasR (Brint and Ohman 1995; Anderson, Zimprich and Rust 1999; Soto-Aceves et al. 2019). We determined that PA7 is able to produce ELA at a level similar to that of PAO1 when cultured in LB medium (Fig. 2A), showing that it has a functional LasR. However, ATCC 9027 is unable to produce ELA (Fig. 2A) even though LasR is expressed at a similar level to that of PAO1 (Fig. 1). The fact that P7-LasR is functional (as is LasR of strain CLJ1 that also produces ELA; Elsen et al. 2014) whereas A-LasR is not, shows that the aspartic acid in position 196 (Figure S1, Supporting Information) is responsible for its deficient ability to activate transcription.

In order to measure the functionality of P-LasR, P7-LasR and A-LasR as transcriptional activators in the same genetic background, we used pUCP24-derived plasmids carrying the genes coding for these three LasR proteins to complement a PAO1  $\Delta$ lasR mutant (Soto-Aceves et al. 2019; Table S1, Supporting Information). We found that while the expression of P-LasR and P7-LasR in PAO1 $\Delta$ lasR complemented the mutation and caused an increased ELA activity compared to the wild type PAO1 strain, the expression of A-LasR from the same plasmid only slightly increased activity of this protease in the PAO1 $\Delta$ lasR that did not reach wild-type levels (Fig. 2B). Furthermore, when the same plasmids were expressed in the ATCC 9027 genetic background, P-LasR expression caused an increased ELA activity, compared with PAO1, P7-LasR expression resulted in ELA activity similar to that of PAO1, and A-LasR did not produced any ELA activity (Fig. 2C). In these experiments a PAO1  $\Delta$ lasR,  $\Delta$ rhlR double mutant was used as a negative control (Fig. 2B and C). Taken together these results show that A-LasR is not functional, and we propose that this deficiency is due to the E196D mutation.

### The expression of a functional LasR protein determines RL production.

In LB medium, RL production depends directly on transcriptional activation by RhlR, and *rhlR* transcription in turn is dependent on LasR. Therefore, we determined the production of these biosurfactants as an indirect measure of LasR ability to transcribe *rhlR*. We found that in both the PAO1 $\Delta$ lasR mutant and in ATCC 9027, RL production showed the same pattern as ELA production when the plasmids expressing the different LasR proteins were introduced (Fig. 3). That is, expression of P-LasR and P7-LasR caused an increased production of RL both in the PAO1 $\Delta$ lasR mutant (Fig. 3A), and in the ATCC 9027 strain (Fig. 3B), while A-LasR did not cause an increase in the production of these biosurfactants. These results suggest that A-LasR is unable to activate *rhlR* transcription and hence the production of RL.

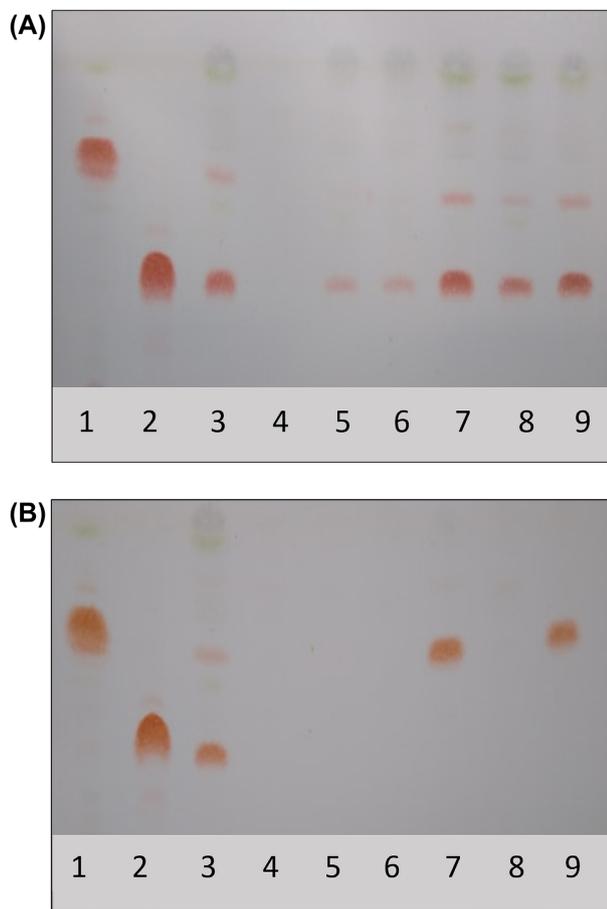
PAO1 strain produces both RL with one rhamnose moiety (mono-RL) as with two rhamnose molecules (di-RL), while ATCC 9027 strain produces only mono-RL, because it lacks *rhlC*, as has



**Figure 2.** A-LasR is unable to activate the production of ELA. (A) ELA production of strains PAO1, PA7 and ATCC 9027 in LB medium. (B) ELA production by PAO1 $\Delta$ lasR complemented with different versions of the *lasR* gene. (C) ELA production by strain ATCC 9027 overexpressing different versions of the *lasR* gene. All data are the mean of three biological replicas. The data were analysed by Tukey test ( $\alpha \leq 0.05$ ); different letters indicate significant differences among the sample means; equal letters indicate no significant differences.

been previously reported (Grosso-Becerra et al. 2016) which is characteristic of strains belonging to clades 3 or 5 (Freschi et al. 2019).

To further confirm that ATCC 9027 inability to produce ELA and RL in LB medium was ultimately determined by LasR inability to activate transcription of *rhlR* we overexpressed RhlR from a plasmid and found that ELA was produced at higher levels than in the PAO1 strain, while ELA activity was only restored to the wild type level in the PAO1 $\Delta$ lasR mutant (Fig. 4A). These results show that as was previously reported, *lasB* is mainly activated by LasR/30-C12-HSL, but that it can also be activated to some extent by RhlR/C4-HSL (Brint and Ohman 1995; Pearson, Pesci and Iglewski 1997). As expected, in the case of RL, RhlR overexpression restored their production in the ATCC 9027 strain cultured in LB medium and increased their production in the PAO1 $\Delta$ lasR mutant (Fig. 4B).

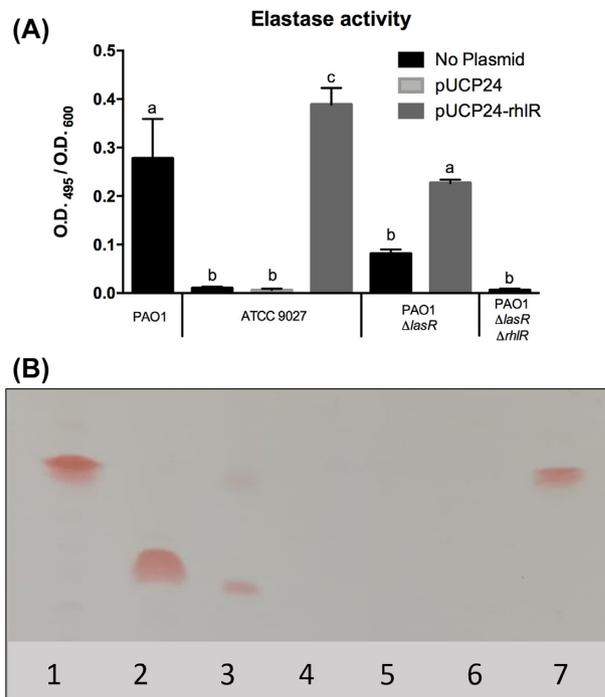


**Figure 3.** Detection of rhamnolipids by thin layer chromatography (TLC). (A) RL production by PAO1 $\Delta$ lasR complemented with plasmids encoding different versions of LasR. Lanes correspond to (1) Mono-rhamnolipid; (2) Di-rhamnolipid; (3) PAO1; (4) PAO1 $\Delta$ rhIR; (5) PAO1 $\Delta$ lasR; (6) PAO1 $\Delta$ lasR/pUCP24; (7) PAO1 $\Delta$ lasR/P-LasR; (8) PAO1 $\Delta$ lasR/A-LasR and (9) PAO1 $\Delta$ lasR/P7-LasR. (B) Production of RL by ATCC 9027 overexpressing different versions of LasR. (1) Mono-rhamnolipid; (2) Di-rhamnolipid; (3) PAO1; (4) PAO1 $\Delta$ rhIR; (5) ATCC 9027; (6) ATCC 9027/pUCP24; (7) ATCC 9027/P-LasR; (8) ATCC 9027/A-LasR and (9) ATCC 9027/P7-LasR.

### Analysis of ATCC 9027 *lasB* promoter

Another factor that could affect the expression of ELA in strain ATCC 9027 and could be involved in its higher activation by RhIR in the ATCC 9027 background (Fig. 4A) is *lasB* regulatory region. Analysis of this DNA sequence in ATCC 9027 and PA7 strains showed that they both contain a *las*-box corresponding to OP2 that is more similar to the consensus sequences recognized by LasR or RhIR than the corresponding sequence in PAO1 strain, since in the former cases there are 12 base pairs between the conserved CT and GC dinucleotides, instead of 11 base pairs that are present in PAO1 (Fig. 5A). The sequence of *lasB* OP1 *las*-box is identical in the three strains (Fig. 5A).

We constructed transcriptional *lacZ* fusions of *lasB* promoter regions of strains PAO1 (pMP220-PlasB-P; Table S1, Supporting Information) and ATCC 9027 (pMP220-PlasB-A, Table S1, Supporting Information) to determine whether the differences in OP2 *las*-box caused a difference in *lasB* expression. We found that the expression of these two transcriptional fusions in the PAO1 background was not significantly different, showing that OP2 sequence differences did not affect LasR-dependent *lasB* expression (Fig. 5B), although it might enhance RhIR-dependent expression of this gene causing ELA overproduction (Fig. 4A).



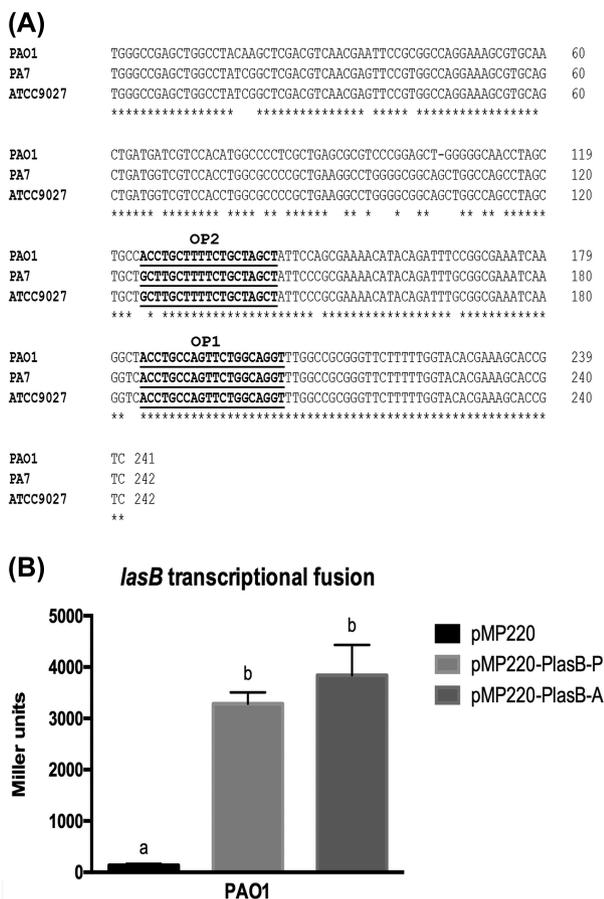
**Figure 4.** RhIR over expression in ATCC 9027 restores ELA and RL production. (A) ELA production in strains overexpressing rhIR. NP means no plasmid. (B) RL production by ATCC 9027 overexpressing rhIR. Lanes correspond to (1) Mono-rhamnolipid standard, (2) Di-rhamnolipid standard, (3) PAO1, (4) PAO1 $\Delta$ rhIR, (5) ATCC 9027, (6) ATCC 9027/pUCP24 and (7) ATCC 9027/pUCP24-rhIR. All data were obtained from the biological triplicate mean. The data were analysed by Tukey test ( $\alpha \leq 0.05$ ), different letters indicate significant differences among the sample means; equal letters indicate no significant differences.

### The ATCC 9027 *rhIR* promoter lacks the LasR/30-C12-HSL *rhIR*-1 binding site, but is still induced by P-LasR.

Our results show that A-LasR is not functional (Fig. 2), but we wanted to know whether this was the only factor involved in the lack of QS-dependent virulence factors production when strain ATCC 9027 is cultured in LB medium. To determine whether this was only due to the inability of A-LasR to induce ATCC 9027 *rhIR* we searched for the LasR binding sites in its promoter region (*rhIR*-1 and *rhIR*-3 *las*-boxes) and found that *rhIR*-1 *las*-box was absent (Fig. 6A), since the invariant CT dinucleotide at the start of *las*-boxes is changed to GA. To determine whether the lack of this LasR DNA binding site was also involved in the lack of virulence factors production in LB medium, we constructed *rhIR-lacZ* fusions derived from the ATCC 9027 *rhIR* gene (plasmid pSEVA-PrhIR-A; Table S1, Supporting Information) and PAO1 *rhIR* (plasmid pSEVA-PrhIR-P; Table S1, Supporting Information) and determined their expression in the PAO1 strain (Fig. 6B). Both *lacZ* fusions were expressed at a similar level (Fig. 6B), showing that the lack of *rhIR*-1 *las*-box do not modify the LasR/30-C12-HSL-dependent expression of ATCC 9027 *rhIR* in the PAO1 background.

### CONCLUDING REMARKS

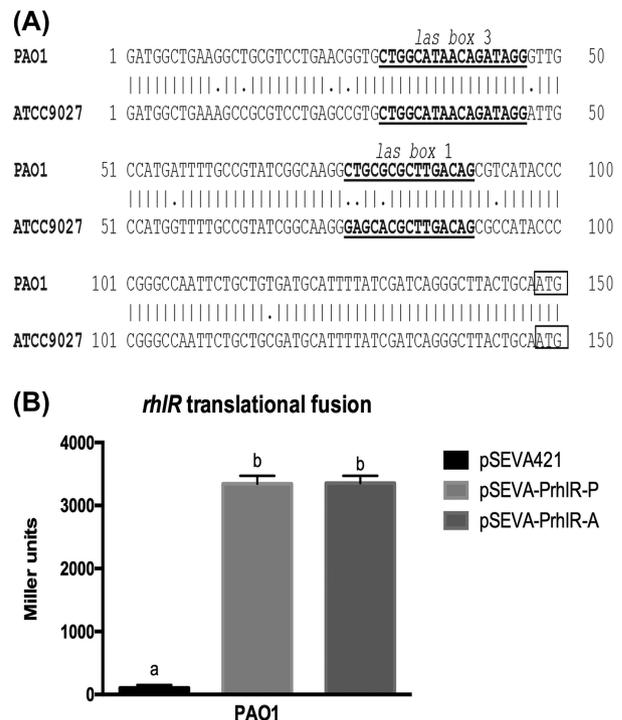
We determined in this work that the production of a defective LasR protein by ATCC 9027 causes a lack of QS-dependent virulence factors production, since genes that are directly activated by this protein, like *lasB*, are not expressed. Our results show



**Figure 5.** Expression of *lasB* is not affected by the change of sequence of OP2 in ATCC 9027 *lasB*. **(A)** Alignment of the *lasB* promoter region made with Multiple Sequence Alignment tools by EMBOSS, between strains PAO1, PA7 and ATCC 9027. The *las* box OP1 and OP2 are outlined. **(B)** Expression of different *lasB*-*lacZ* versions in PAO1 genetic background. *lasB* promoter of PAO1 and ATCC 9027 were used in the plasmid pMP220-PlasB-P and pMP220-PlasB-A (Table S1, Supporting Information), respectively. All data are the mean of three biological replicates. The data were analysed by Tukey test ( $\alpha \leq 0.05$ ); different letters indicate significant differences among the sample means; equal letters indicate no significant differences.

that the ATCC 9027 LasR protein has a reduced ability to activate transcription most likely due to an E196D mutation (Figure S1, Supporting Information).

We ruled out that the mutation A138V was responsible for LasR defective activity, even though position 138 is located at one end of  $\alpha$ -helix 6 that participates in the dimerization interphase and AI-binding, because LasR protein of the hemolytic *P. aeruginosa* CLJ1 strain is functional since ELA was detected in the secretome of this strain (Elsen et al. 2014). Also, the LasR protein of strain CR1 (that contains a valine in position 138) is functional since this strain produces RL when cultured in LB medium with glycerol (Sood et al. 2020). Furthermore, it is not expected that a valine in position 138 would distort LasR  $\alpha$ -helix 6 that is involved in autoinducer binding. On the other hand, even though aspartic and glutamic acids are both acidic, negatively-charged amino acids, it seems that the difference in the size of the side chain between these two amino acids is critical in position 196, which forms part of the helix-turn-helix motif that establishes contact with DNA. It is likely that the shorter side chain of aspartic acid unable LasR to establish the same contacts at the binding site that the longer side chain of glutamic



**Figure 6.** The LasR-dependent expression of *rhIR* is not dependent on *rhIR*-1 *las*-box. **(A)** Alignment of *rhIR* promoter sequence used to construct the plasmids pSEVA PrhIR-P and pSEVA-PrhIR-A (Table S1, Supporting Information). The *las*-boxes are shown in boldface and underlined. The start codon of *rhIR* is boxed. **(B)** Expression of different *rhIR*-*lacZ* versions of PAO1 and ATCC 9027 in the genetic background of PAO1. All data are the mean of three biological replicates. The data were analysed by Tukey test ( $\alpha \leq 0.05$ ); different letters indicate significant differences among the sample means; equal letters indicate no significant differences.

acid does, and which are critical for transcriptional activation. This conclusion is supported by the fact that A-LasR is the only LasR protein with an aspartic acid in position 196 among the 15 LasR sequences analyzed (Figure S1, Supporting Information), and that it is conserved in several LasR homologs present in different bacteria (Chowdhury and Bagchi 2016).

We have previously reported that when strain ATCC 9027 is cultured in the phosphate-limited medium PPGAS it produces PYO and small amounts of RL (Grosso-Becerra et al. 2016), which are both RhlR-dependent virulence-traits. These results mean that in this phosphate limited medium RhlR is expressed in the absence of LasR (since A-LasR is not functional as we have shown here). This can be explained considered that it has been recently shown that in phosphate limited conditions the QS network is modified, and that *rhIR* is induced in a PhoR/PhoB dependent manner (Meng, Ahator and Zhang 2020).

Another difference of ATCC 9027 and PA7 strains compared with PAO1 strain is that the LasR DNA-binding sequence corresponding to OP2 in the *lasB* regulatory region is more similar to *las*-boxes that are recognized by LasR and/or RhlR (Fig. 5A). In addition, we showed that ATCC 9027 *rhIR* lacks the *rhIR*-1 *las*-box, which was proposed to be important for the LasR/3O-C12-HSL dependent induction (Medina et al. 2003). However, we showed here that ATCC 9027 *rhIR* is expressed at a similar level in the PAO1 background as PAO1 *rhIR* that contains the *rhIR*-1 *las* box and that this expression is dependent on LasR (Fig. 6).

The results shown in this work contribute to the understanding of the QS-response of the avirulent ATCC 9027 *P. aeruginosa*

strain. It is worth noting that QS plays a secondary role, if any, in the virulence of this strain, since we have previously reported that an ATCC 9027 derivative with a plasmid over-expressing *rhlR*, that complements the production of the QS-regulated virulence associated traits, did not turn this strain virulent when tested in the model of intraperitoneal injection of mice (Grosso-Becerra et al. 2016). These results show that the inability of ATCC 9027 strain to establish pathogenic interactions is multifactorial, and the effect of increasing the expression of *exlBA* in this phenomenon remains to be determined.

In summary, *P. aeruginosa* ATCC 9027 contains an atypical QS response characterized by a non-functional LasR transcriptional activator, which does not seem to be the only factor involved in its inability to establish a pathogenic interaction. The understanding of ATCC 9027 QS response is of great importance for the molecular characterization of this strain that has potential biotechnological applications for the industrial production of RL biosurfactants.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at [FEMSLE](https://femsle.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/femsle.12258) online.

## FUNDING INFORMATION

This work was supported in part by grant IN201819 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, (Dirección General de Asuntos del Personal Académico –UNAM) and grant 252269 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## ACKNOWLEDGMENTS

SGR is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), MPSA is a doctoral student of Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM. SGR (fellowship number 437562, CVU-592578) and MPSA (CVU-741217) received a fellowship from CONACYT.

**Conflicts of interests.** None declared.

## REFERENCES

- Abelyan N, Grabski H, Tiratsuyan S. In silico screening of flavones and its derivatives as potential inhibitors of quorum-sensing regulator LasR of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Biol* 2020;**54**:134–43.
- Anderson RM, Zimprich CA, Rust L. A second operator is involved in *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) activation. *J Bacteriol* 1999;**181**:6264–70.
- Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL et al. Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2002;**184**:3605–13.
- Brint JM, Ohman DE. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* 1995;**177**:7155–63.
- Cadoret F, Soscia C, Voulhoux R. *Pseudomonas Methods and Protocols*, 1st edn, Filloux A, Ramos JL (eds.). New York: Humana Press, New York, NY, 2014.
- Chen R, Déziel E, Groleau M-C et al. Social cheating in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing variant. *Proc Natl Acad Sci* 2019;**116**:7021–6.
- Chong H, Li Q. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microb Cell Fact* 2017;**16**:1–12.
- Chowdhury N, Bagchi A. Molecular insight into the activity of LasR protein from *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of virulence gene expression by this organism. *Gene* 2016;**580**:80–7.
- Cruz RL, Asfahl KL, Sara VB et al. RhlR-regulated acyl-homoserine lactone quorum sensing in a cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 2020;**11**:e00532–20.
- Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007;**67**:351–68.
- Elsen S, Huber P, Bouillot S et al. A type III secretion negative clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* employs a two-partner secreted exolysin to induce hemorrhagic pneumonia. *Cell Host Microbe* 2014;**15**:164–76.
- Feltner JB, Wolter DJ, Pope CE et al. LasR variant cystic fibrosis isolates reveal an adaptable quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 2016;**7**:e01513–16.
- Freschi L, Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I et al. Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Front Microbiol* 2015;**6**:1–8.
- Freschi L, Vincent AT, Jeukens J et al. The *Pseudomonas aeruginosa* pan-genome provides new insights on its population structure, horizontal gene transfer, and pathogenicity. *Genome Biol Evol* 2019;**11**:109–20.
- Fukushima J, Ishiwata T, Kurata M et al. Intracellular receptor-type transcription factor, LasR, contains a highly conserved amphipathic region which precedes the putative helix-turn-helix DNA binding motif. *Nucleic Acids Res* 1994;**22**:3706–7.
- García-Reyes S, Soberón-Chávez G, Cocotl-Yanez M. The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *J Med Microbiol* 2020;**69**:25–34.
- Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 2013;**67**:159–73.
- Grosso-Becerra M-V, González-Valdez A, Granados-Martínez MJ et al. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is a non-virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016;**100**:9995–10004.
- Grosso-Becerra M-V, Santos-Medellín C, González-Valdez A et al. *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics* 2014;**15**:1–14.
- Higgins S, Heeb S, Rampioni G et al. Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;**8**:1–13.
- Huang H, Shao X, Xie Y et al. An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun* 2019;**10**:1–13.
- Kostylev M, Kim DY, Smalley NE et al. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy. *Proc Natl Acad Sci* 2019;**116**:7027–32.
- Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 2014;**6**:26–41.
- Mai-Prochnow A, Bradbury M, Ostrikov K et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm response and resistance to cold atmospheric pressure plasma is linked to the redox-active molecule phenazine. *PLoS One* 2015;**10**:e0130373.

- Matsuyama T, Sogawa M, Yano I. Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. *Appl Environ Microbiol* 1987;53:1186–8.
- Medina G, Juárez K, Díaz R et al. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 2003;149:3073–81.
- Meng X, Ahator S D, Zhang L-H. Molecular mechanisms of phosphate stress activation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems. *mSphere* 2020;5:e00119–20.
- Miller JH. Experiments in molecular genetics. *Publ by Cold Spring Harb Lab (Cold Spring Harb Lab NY)* 1992;433:352–5.
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:1–29.
- Morales E, González-Valdez A, Servin-González L et al. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing response in the absence of functional LasR and LasI proteins: the case of strain 148, a virulent dolphin isolate. *FEMS Microbiol Lett* 2017;364:1–10.
- Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* 1997;179:5756–67.
- Pesci EC, Pearson JP, Seed PC et al. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1997;179:3127–32.
- Qiu H, Li Y, Dai W. Codon-usage frequency mediated SNPs selection in *lasR* gene of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microbiol Res* 2019;223–225:137–43.
- Reboud E, Elsen S, Bouillot S et al. Phenotype and toxicity of the recently discovered *exlA*-positive *Pseudomonas aeruginosa* strains collected worldwide. *Environ Microbiol* 2016;18:3425–39.
- Roy PH, Tetu SG, Larouche A et al. Complete genome sequence of the multidrug-resistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS One* 2010;5:e8842.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn, Evans GA (ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Sood U, Hira P, Kumar R et al. Comparative genomic analyses reveal core-genome-wide genes under positive selection and major regulatory hubs in outlier strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 2019;10:1–23.
- Sood U, Singh DN, Hira P et al. Rapid and solitary production of mono-rhamnolipid biosurfactant and biofilm inhibiting pyocyanin by a taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* strain CR1. *J Biotechnol* 2020;307:98–106.
- Soto-Aceves MP, Cocotl-Yañez M, Merino E et al. Inactivation of the quorum-sensing transcriptional regulators LasR or RhlR does not suppress the expression of virulence factors and the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 2019;165:425–32.
- Trouillon J, Sentausa E, Ragno M et al. Species-specific recruitment of transcription factors dictates toxin expression. *Nucleic Acids Res* 2020;48:2388–400.
- Van Der Plas MJA, Bhongir R KV, Kjellström S et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase cleaves a C-terminal peptide from human thrombin that inhibits host inflammatory responses. *Nat Commun* 2016;7:1–13.
- Williams P, Cámara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 2009;12:182–91.

# The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein

Selene García-Reyes<sup>1</sup>, Gloria Soberón-Chávez<sup>1</sup> and Miguel Cocotl-Yanez<sup>2,\*</sup>

## Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that produces several virulence factors such as lectin A, pyocyanin, elastase and rhamnolipids. These compounds are controlled transcriptionally by three quorum-sensing circuits, two based on the synthesis and detection of *N*-acyl-homoserine-lactone termed the Las and Rhl system and a third system named the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) system, which is responsible for generating 2-alkyl-4(1H)-quinolones (AQs). The transcriptional regulator called PqsR binds to the promoter of *pqsABCDE* in the presence of PQS or HHQ creating a positive feedback-loop. PqsE, encoded in the operon for AQ synthesis, is a crucial protein for pyocyanin production, activating the Rhl system by a still not fully understood mechanism. In turn, the regulation of the PQS system is modulated by Las and Rhl systems, which act positively and negatively, respectively. This review focuses on the PQS system, from its discovery to its role in *Pseudomonas* pathogenesis, such as iron depletion and pyocyanin synthesis that involves the PqsE protein – an intriguing player of this system.

## INTRODUCTION

Bacteria coordinate their activities by producing and detecting small diffusible signalling molecules (autoinducer) allowing them to behave collectively. Such collective behaviour, known as ‘quorum sensing’ (QS), plays a pivotal role in the lifestyle of both beneficial and pathogenic bacteria. The QS system was firstly reported in the marine bacteria *Aliivibrio fischeri* (*Vibrio fischeri*), which produce bioluminescence when the cell-population density is sufficient to produce the accumulation of the autoinducer [1]. Later, homologues to the QS system of *A. fischeri* were discovered in several bacteria including *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* is a Gram-negative bacterium that is commonly found in soil and water. This bacterium is known to infect a broad range of hosts, including plants and animals; in fact, *P. aeruginosa* is the most prevalent human pathogen for individuals with airways diseases [e.g. cystic fibrosis (CF)] as well as immunocompromised, burned or wounded patients [2, 3]. *P. aeruginosa* is able to synthesize and release multiple extracellular virulence factors, including elastase [4], alkaline protease [5], hydrogen cyanide [6], exotoxin A [5], rhamnolipids [4, 7, 8], pyocyanin

[9], extracellular polymeric substrates [10]; the synthesis of which is controlled by QS. In *P. aeruginosa*, the QS system consists of two *N*-acyl-homoserine-lactone (AHL) regulatory circuits (*las* and *rhl*) and a non-AHL-mediated QS signalling pathway using alkyl-4-quinolones (AQs), which are hierarchically connected [11–13] (Fig. 1).

Among the virulence factors produced by *P. aeruginosa*, elastase was the first one to be studied in relation to its transcriptional regulation. This protease is encoded by the *lasB* gene, and its regulation was instrumental for the discovery of the three *P. aeruginosa* QS systems. In 1991, *P. aeruginosa* PA103, a strain which is unable to synthesize the LasB enzyme but with an intact structural gene, allowed the discovery of the LasR regulator because of its ability to restore elastase production [14]. Three years later the transcriptional regulator of the second QS system (RhlR) was identified using a mutant strain of *P. aeruginosa* unable to produce rhamnolipids and by 1995 its autoinducer, *N*-butyryl-homoserine-lactone (C4-HSL), was discovered using a *lasB* transcriptional fusion in a *lasR* mutant strain [15–17]. By 1999, Pesci et al. [18] discovered a new autoinducer different to 3-oxo-C12-HSL and C4-HSL

Received 02 September 2019; Accepted 08 November 2019; Published 03 December 2019

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Departamento de Biología molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apdo Postal 70228, C.P. 04510, Ciudad de México, Mexico; <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad 3000, Cd. Universitaria, C.P. 04510, Coyoacán, Ciudad de México, Mexico.

\*Correspondence: Miguel Cocotl-Yanez, miguel.cocotlyanez@iibiomedicas.unam.mx

**Keywords:** 2-alkyl-4-quinolone; pyocyanin; quorum-sensing; *Pseudomonas aeruginosa*; virulence.

**Abbreviations:** AHL, *N*-acyl-homoserine-lactone; AQs, 2-alkyl-4(1H)-quinolones; CF, cystic fibrosis; C4-HSL, *N*-butyryl-homoserine-lactone; DHQ, hydroxy-1H-quinolin-2-one; HHQ, 2-heptyl-1H-quinolin-4-one; HHQNO, 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide; HQNO, 2-heptyl-1-hydroxyquinolin-4-one; NHQ, 2-nonyl-4-quinolinol; 3-oxo-C12-HSL, *N*-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone; PCA, phenazine-1-carboxylic acid; PQS, 2-heptyl-3-hydroxy-1H-quinolin-4-one; QS, Quorum sensing.

# Tracking the genome of four *Pseudomonas aeruginosa* isolates that have a defective Las quorum-sensing system, but are still virulent

Enrique Martínez-Carranza, Selene García-Reyes, Abigail González-Valdez and Gloria Soberón-Chávez\*

## Abstract

In this work we analysed the whole genome extended multilocus sequence typing (wgMLST) of four *Pseudomonas aeruginosa* strains that are characterized by being virulent despite having a defective Las quorum-sensing (QS) system, and compare them with the wgMLST of the PA01 and PA14 type strains. This comparison was done to determine whether there was a genomic characteristic that was common to the strains with an atypical QS response. The analysed strains include two environmental isolates (ID 4365 isolated from the Indian Ocean, and M66 isolated from the Churince water system in Cuatro Ciénegas Coahuila, México), one veterinary isolate (strain 148 isolated from the stomach of a dolphin) and a clinical strain (INP43 that is a cystic fibrosis pediatric isolate). We determine that the six analysed strains have a core genome of 4689 loci that was used to construct a wgMLST-phylogeny tree. Using the cano-wgMLST\_BacCompare software we found that there was no common genomic characteristic to the strains with an atypical QS-response and we identify ten loci that are highly discriminatory of the six strains' phylogeny so that their MLST can reconstruct the wgMLST-phylogeny tree of these strains. We discuss here the nature of these ten highly discriminatory genes in the context of *P. aeruginosa* virulence and evolution.

## INTRODUCTION

*P. aeruginosa* is a wide-spread environmental bacterium, but is also an important opportunistic pathogen. *P. aeruginosa* infections represent a serious health problem due to its high intrinsic and acquired antibiotic resistance [1] and its production of different virulence associated traits [2, 3]. Several of the virulence factors produced by this bacterium, including, elastase (ELA), pyocyanin (PYO) and rhamnolipids (RL), are regulated at the level of transcription by a complex regulatory cascade called quorum-sensing (QS) [4]. The LasR transcriptional regulator constitutes the top of the QS regulatory cascade that when coupled with the autoinducer (AI) 3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone (3O-C12-HSL) activates the transcription of ELA and other virulence associated traits. LasR/3O-C12-HSL also activates the transcription of *rhIR* and *rhII*, which encode a second transcriptional regulator (RhIR) and its cognate AI, butanoyl-homoserine lactone (C4-HSL). In addition LasR/3O-C12-HSL also activates the transcription of the gene encoding PqsR, the transcriptional regulator of the third QS system that uses alkyl quinolones

as AI. RhIR/C4-HSL in turn activates the transcription of the genes involved in the production of PYO and RL [4]. It has been reported that *pqsE*, a gene that forms part of the *pqsABCDE* operon that is activated by PqsR, encodes an enzyme that produces an as yet unidentified AI that interacts with RhIR, modifying its transcriptional activity [5]. The virulence of *P. aeruginosa* is not only determined by the QS cascade, but other factors such as the type III secretion system are also involved [6, 7].

The genomic constitution of *P. aeruginosa* is unique since contrary to other bacteria, the virulence associated genes form part of its core-genome [8] and clinical and environmental isolates constitute a single population with high genome conservation [9]. *P. aeruginosa* species contains three clades, two of which are highly similar and the third clade is genetically more diverse [10]. Clade 1 type strain is PA01, Clade 2 type strain is PA14 and PA7 outlier strain is the type strain of Clade 3. Strains belonging to all clades are geographically diverse and include both clinical and environmental isolates. The only case of endemism that has been reported are the

Received 15 January 2020; Accepted 14 April 2020; Published 19 May 2020

**Author affiliations:** <sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Apdo. Postal 70228, C. P. 04510, CDMX, México.

\*Correspondence: Gloria Soberón-Chávez, gloria@biomedicas.unam.mx

**Keywords:** bacterial evolution; *Pseudomonas aeruginosa*; type three secretion system.

**Abbreviations:** AI, autoinducer; QS, quorum sensing regulatory network; wgMLST, whole genome multilocus sequence typing.

000132 © 2020 The Authors



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.