



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Regulación de los sistemas sensores de quórum en condiciones de bajo fosfato en *Pseudomonas aeruginosa*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

MARTÍN PAOLO SOTO ACEVES

TUTOR PRINCIPAL:

GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ

Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

CINTHIA ERNESTINA NUÑEZ LÓPEZ.

Instituto de Biotecnología.

VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN.

Instituto de Biotecnología.

Ciudad de México. Agosto, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Regulación de los sistemas sensores de quórum en condiciones
de bajo fosfato en *Pseudomonas aeruginosa*

Martín Paolo Soto Aceves

Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Gloria Soberón Chávez.

Agradecimientos

A la Dra. Gloria Soberón Chávez, por su apoyo y amabilidad desde el primer momento en que le solicité unirme al laboratorio, por sus enseñanzas, por su confianza, por la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.

Al comité tutorial: Dra. Cinthia Nuñez y Dr. Víctor Bustamante, por su constante apoyo, amabilidad, disposición y sus valiosas aportaciones tanto para mi proyecto como para mi formación profesional.

Al jurado de examen, por la revisión crítica de este trabajo y sus comentarios que contribuyeron a mejorar el presente escrito.

A la Dra. Abigail González, por su constante asesoría técnica en el laboratorio.

Al Dr. Miguel Cocotl Yañez, por su valioso apoyo y sus aportaciones constructivas desde el momento en que inicié este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio: Selene, Fany, Quique, Abi, Miguel y Fer, por hacer amenos y divertidos los días en el laboratorio, por su apoyo, por nuestras pláticas y discusiones tanto científicas como cotidianas.

A mi familia: Mamá, Papá, Alonso, Mariana, Montse, Fernanda y Braulio, por ser mi soporte, mis raíces, porque su presencia en mi vida me hacen fuerte y capaz de hacer lo que me proponga.

A mis Abuelitas, Abuelitos, Tías, Tíos, Primas, Primos y Sobrinos, en especial a los que trascendieron de este mundo en este año; **Abuelito Elias y Tío Moy**: influyeron en mi vida de muchísimas maneras, sin ustedes no sería quien soy, los llevo siempre conmigo.

A mis amigos, especialmente a Jonathan, Rubén y Xóchitl, por siempre estar ahí, escucharme y apoyarme en este viaje.

A la UNAM, por convertirse en mi casa y brindarme una formación multidisciplinaria que me permitió desarrollarme en la investigación científica, la docencia, e incluso las artes.

Al CONACYT y su programa de becas para estudiantes, al **Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP)** y a los donativos PAPIIT (IN201819) y CONACYT (CB-252269) que hicieron posible el desarrollo de este proyecto y mi participación en él.

Índice general

Resumen	9
1. Introducción	11
1.1. Generalidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.2. El sistema sensor de quórum o <i>quorum sensing</i>	12
1.3. El <i>quorum sensing</i> en <i>P. aeruginosa</i>	13
1.4. Los sistemas Las y Rhl	14
1.5. El sistema Pqs	15
1.6. Relación entre los sistemas de <i>quorum sensing</i>	16
1.7. Factores de virulencia regulados por <i>quorum sensing</i>	17
2. Antecedentes	21
2.1. ¿Por qué estudiar condiciones de bajo fosfato?	21
2.2. Los sistemas de QS de <i>P. aeruginosa</i> en condiciones de bajo fosfato	22
2.3. El sistema PhoB-PhoR	23
3. Objetivos	25
3.1. Objetivo general	25
3.1.1. Objetivos particulares	25

4. Material y métodos	27
4.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	27
4.2. Condiciones de cultivo de las cepas	32
4.3. Extracción y manipulación de DNA	33
4.4. Protocolo de transformación	33
4.5. Generación de mutante en <i>phoB</i> en <i>P. aeruginosa</i>	34
4.6. Construcción de fusiones transcripcionales	34
4.7. Medición de actividad de fusiones <i>lux</i> y <i>lacZ</i>	35
4.8. Cuantificación de factores de virulencia	36
4.9. Ensayo de Movilidad Electroforética (EMSA)	36
4.10. Extracción y secuenciación de RNA	37
4.11. Retrotranscripción - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	38
5. Resultados	39
5.1. Producción de factores de virulencia en bajo fosfato	39
5.2. El sistema Rhl: RhlR se sobreexpresa en bajo fosfato	44
5.3. Relevancia de los sistemas de QS en la producción de factores de virulencia en bajo fosfato	49
5.4. El sistema Las: LasR es dispensable en condiciones de bajo fosfato	52
5.5. La producción de pirocianina en el medio con bajo fosfato depende del operón <i>phzA1</i>	57
5.6. PhoB y su relación con PqsE	59
6. Discusión	63
6.1. La flexibilidad de los sistemas de QS	63
6.2. La producción de factores de virulencia en bajo fosfato	65

6.3. LasR como regulador negativo de la respuesta de QS	67
7. Conclusiones	73
8. Perspectivas	75
Referencias	76
Referencias	76
Anexo 1: Genes regulados positivamente por LasR	87
Anexo 2: Genes regulados negativamente por LasR	95
Anexo 3: Localización de cajas <i>las-rhl</i> putativas	97
Anexo 4: Artículo publicado	99

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa considerada un patógeno oportunista de plantas y animales, su resistencia intrínseca a una gran cantidad de antibióticos la convierte en una de las principales causas de infecciones nosocomiales. La virulencia de *P. aeruginosa* se debe a la gran variedad de factores extracelulares que produce cuya síntesis es regulada por sistemas sensores de quórum o *quorum sensing* (QS). Este tipo de sistemas se basa en la acumulación de moléculas señal que son reflejo de la densidad celular, las cuales en conjunto con proteínas reguladoras modulan la expresión de genes específicos. Esta especie cuenta con tres sistemas de QS; dos de ellos basados en la detección de N-acil-homoserina lactonas (sistemas Las y Rhl) y uno en la detección de 2-alkil-4(1H)-quinolonas (sistema Pqs), estos sistemas están relacionados de manera jerárquica, siendo el sistema Las el que regula positivamente a los otros dos sistemas. Esta jerarquía ha sido descrita en bacterias crecidas en medios ricos y ha sido el referente para propuestas en las que se pretende apagar la respuesta de QS bloqueando al sistema Las. En el presente proyecto, se demuestra cómo en un medio con bajo fósforo el sistema Las pasa a ser dispensable. Lo anterior se sustenta principalmente a dos niveles: a) Expresión genética: al inactivar a LasR no se genera ningún cambio significativo en el patrón de expresión genética (RNAseq) y b) Fenotipo: al inactivar a LasR no se afecta significativamente la producción de factores de virulencia. En el caso del sistema Rhl, su importancia en esta condición es evidenciada por la sobreexpresión de *rhlR*, dicha expresión es mediada directamente por PhoB, como se demuestra en el presente trabajo. Además, Rhl se vuelve completamente responsable de la expresión de factores de virulencia, incluso de la elastasa (LasB), la cual en medio rico depende también del sistema Las. Esta reestructuración de la jerarquía de los sistemas de QS es muy relevante debido a que la bac-

teria se enfrenta a condiciones de bajo fosfato al momento de establecer una infección. Por lo anterior, es de suma importancia comprender la regulación de los sistemas de QS en este tipo de ambientes para poder plantear propuestas anti-QS más acertadas, dado que, inactivar al sistema Las en esta condición no tendría efecto.

Capítulo 1

Introducción

1.1. Generalidades de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, aeróbica, presenta morfología de bacilos de 0.5-0.8 μm por 1.5-3.0 μm , la mayoría de las cepas presentan un solo flagelo polar y se encuentra distribuida ampliamente en la naturaleza. Es un patógeno oportunista en animales y plantas debido a que produce un gran número de factores de virulencia. Tiene la capacidad de crecer óptimamente entre 25°C - 37°C. Sin embargo, puede crecer lentamente o al menos sobrevivir a mayores y menores temperaturas; su habilidad para crecer a 42°C la distingue de muchas otras especies de *Pseudomonas*.

Como se mencionó, esta especie produce una gran variedad de factores que contribuyen a su virulencia como son la toxina A, cuya toxicidad se atribuye a su habilidad para inhibir la síntesis de proteínas; las hemolisinas, de las cuales se encuentra mayor producción en cepas clínicas que en cepas ambientales; la piocianina, la cual es un metabolito secundario con la capacidad para oxidar y reducir otras moléculas y se ha demostrado que retarda el crecimiento de otras bacterias facilitando la colonización por *P. aeruginosa*; las proteasas, que contribuyen a la destrucción del tejido, entre otros (Iglewski, 1996).

La principal razón de su estudio se debe a que su adaptabilidad y resistencia intrínseca a una gran cantidad de antibióticos la convierten en uno de los patógenos oportunistas más

importantes en personas que padecen enfermedades de las vías respiratorias como fibrosis quística, bronquiectasia, y enfermedad obstructiva crónica; además es una de las mayores causas de infecciones nosocomiales, principalmente en la unidad de cuidados intensivos. Como resultado de esto, las infecciones por *P. aeruginosa* muestran altos índices de morbilidad y mortalidad, especialmente en pacientes con el padecimiento genético llamado fibrosis quística (Fagon *et al.*, 1996).

1.2. El sistema sensor de quórum o *quorum sensing*

Los factores de virulencia de *P. aeruginosa* son controlados a nivel transcripcional a través del sistema de *quorum sensing* (QS). El sistema QS es el mecanismo por el cual la bacteria regula la expresión de genes específicos en respuesta a una concentración crítica de moléculas señal que se producen de manera endógena y son reflejo de la densidad de población (Venturi, 2006). Estas moléculas, llamadas autoinductores, son producidas constitutivamente por cada bacteria y actúan como co-factores de proteínas reguladoras específicas de la transcripción cuando alcanzan altas concentraciones, lo que desencadena una respuesta coordinada de activación de genes específicos en toda la población (Gellatly y Hancock, 2013).

El QS fue descubierto en *Aliivibrio fischeri* especie bacteriana marina la cual emite bioluminiscencia cuando hay una alta densidad celular gracias a la inducción del operón que codifica para la luciferasa. Esta bacteria vive en asociación con varios hospederos eucariontes (peces, calamares, etc.), los cuales han desarrollado órganos especializados donde habita *A. fischeri* a una gran densidad celular, cada hospedero utiliza la luminiscencia para distintos propósitos como son atraer presas, encontrar pareja, entre otros (Miller y Bassler, 2001). El sistema de QS de *A. fischeri* comprende a dos proteínas llamadas LuxI y LuxR; LuxI es la sintasa del autoinductor N-3-oxohexanoil-homoserina lactona que se une al regulador transcripcional LuxR y juntos activan la transcripción del operón *luxICDABE* responsable de la producción de luminiscencia (Engebrecht y Silverman, 1984). El operón *luxICDABE* se transcribe de manera basal todo el tiempo, por lo que el autoinductor es producido a bajo nivel de manera constitutiva, por lo tanto, la cantidad de autoinductor el cual difunde libremente por la membrana es reflejo de la densidad celular; de esta manera cuando la densidad es baja

no hay suficiente autoinductor para activar la transcripción, pero cuando la densidad celular es alta el autoinductor se acumula a una concentración suficiente (1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que es capaz de unirse a la proteína LuxR citoplasmática, dicha interacción propicia que el sitio de unión al DNA de LuxR quede expuesto y pueda unirse al DNA y activar la transcripción del operón (Hanzelka y Greenberg, 1995).

1.3. El *quorum sensing* en *P. aeruginosa*

P. aeruginosa posee tres sistemas de QS, dos de ellos denominados Las y Rhl funcionan como el sistema descrito para *A. fischeri* basados en la síntesis de N-acil-homoserina-lactonas (AHL), que actúan como inductores de un sistema de detección y respuesta. En el sistema *las*, LasI es la sintasa que dirige la síntesis de N-3-oxododecanoil-homoserina-lactona (3-O-C12-HSL) la cual interacciona con LasR y activa los promotores de sus genes blanco (Passador *et al.*, 1993). En el sistema *rhl*, es RhlII quien dirige la producción de N-butanoil-homoserina-lactona (C4-HSL) quien interacciona con RhlR y activa los promotores blanco (Winson *et al.*, 1995). Ambos sistemas están relacionados y regulan la producción de múltiples factores de virulencia. Los genes que codifican para las sintasas de cada AHL son expresados a nivel basal y las AHLs producidas difunden cruzando la envoltura celular y acumulándose progresivamente en el medio extracelular. La autoinducción se genera cuando la acumulación de una AHL alcanza una concentración umbral, lo que provoca la activación de los reguladores transcripcionales LasR y RhlR, de esta manera, se encargan de promover la transcripción de los genes *lasI* y *rhlII*, respectivamente, generando un circuito de retroalimentación positivo (Seed *et al.*, 1995). El tercer sistema de QS se denomina Pqs (Pseudomonas quinolone signal), éste se basa en la síntesis y detección de alquil-quinolonas (denominadas PQS y HHQ), las cuales interaccionan con la proteína reguladora PqsR para regular la producción de ciertos factores de virulencia. Específicamente, se ha demostrado que mutantes en dicho sistema muestran una producción disminuida de factores como piocianina, elastasa y ramnolípidos (Diggle *et al.*, 2003). Este sistema también se encarga de regular positivamente la transcripción del operón *pqsABCDE* implicado en la síntesis de alquil-quinolonas, generando de esta manera su propio circuito de retroalimentación (McGrath *et al.*, 2004; Maura *et al.*, 2016).

1.4. Los sistemas Las y Rhl

Los sistemas Las y Rhl fueron los primeros en ser descritos y por lo tanto han sido mayormente estudiados con el objetivo de conocer su relación, los genes blanco que activan y los mecanismos moleculares por los que se logra dicha activación. LasR, la proteína reguladora del sistema Las, fue identificada por tener una función clave en la regulación del gen *lasB* codificante de elastasa (Gambello e Iglewski, 1991); sin embargo, también se demostró que esta proteína regula la expresión de *aprA*, *lasA* and *toxA* (Gambello *et al.*, 1993; Toder *et al.*, 1991), genes codificantes para proteasas y toxina A, por lo que la activación mediada por LasR/3-O-C12-HSL se pensó como un sistema regulador global de la virulencia.

LasR es una proteína de la familia LuxR, los miembros de esta familia son activadores transcripcionales que tienen homología con LuxR en dos regiones de la proteína; una región localizada en la porción amino terminal que se sugiere es necesaria para la unión al autoinductor y una región que se encuentra en la porción carboxilo terminal donde se encuentra el dominio de unión a DNA el cual contiene un motivo hélice-vuelta-hélice (Stevens y Greenberg, 1999). Para que LasR realice su función activadora requiere que exista 3-O-C12-HSL en el medio desde que la proteína es sintetizada ya que promueve que ésta se pliegue de manera adecuada, una vez que se ha sintetizado la proteína se dimeriza formando un complejo que contiene dos monómeros de LasR cada uno unido a una molécula de 3-O-C12-HSL, de esta manera el complejo es capaz de unirse al DNA (Kiratisin *et al.*, 2002; Bottomley *et al.*, 2007).

En el caso del sistema Rhl se demostró que controla la producción de varios factores de virulencia como son piocianina, hemolisina, ramnolípidos e incluso elastasa (Brint y Ohman, 1995). RhlR también es una proteína de la familia LuxR por lo que se sugiere funciona de manera similar a LasR, sin embargo se ha demostrado que RhlR puede dimerizar en ausencia de su autoinductor (Ventre *et al.*, 2003) y además es capaz de unirse a algunos de sus sitios blanco en presencia y ausencia de su autoinductor C4-HSL (Medina, Juárez, *et al.*, 2003; González-Valdez *et al.*, 2014). No obstante para su actividad como activador de la transcripción es necesaria la presencia del complejo RhlR/C4-HSL al igual que el sistema Las (Latifi *et al.*, 1996; Pesci *et al.*, 1997).

Como se mencionó anteriormente, la activación de los genes blanco de cada sistema se

lleva a cabo mediante interacción directa de los complejos LasR/3-O-C12-HSL y RhlR/C4-HSL con secuencias de DNA conservadas las cuales se encuentran en la región reguladora de los genes blanco. Dicha secuencia se ha denominado caja *las-rhl* y fue descrita analizando algunas secuencias de unión a LasR, RhlR o a ambos que habían sido identificadas previamente. Se trata de una secuencia de 20 pb en donde en la mayoría de los casos permanecen invariables los nucleótidos 3, 4, 17, 18 (Tabla 1.1) (Schuster *et al.*, 2003; Soberón-Chávez *et al.*, 2005; González-Valdez *et al.*, 2014). Sin embargo se ha observado que no todos los genes blanco del sistema Las cuentan con secuencias parecidas a las secuencias consenso (Schuster y Greenberg, 2007); esto es compatible con las observaciones de que LasR es capaz de interaccionar con distintas secuencias, varias de ellas con poca conservación haciéndolas difícil de predecir (Schuster *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2021), lo que sugiere que presenta una interacción compleja.

Gen	caja <i>las-rhl</i>
<i>rsaL</i>	AACTAGCAAATGAGATAGAT
<i>lasI</i>	ATCTATCTCATTGCTAGTT
<i>lasA</i>	TACTGGAAAAGCTGATAGTT
<i>lecA</i>	TCCTGCATGAATTGGTAGGC
<i>rhlA</i>	TCCTGTGAAATCTGGCAGTT

Tabla 1.1: Ejemplo de cajas *las-rhl*. Se resaltan en negritas lo nucleótidos 3, 4, 17 y 18 considerados como invariables. Extracto de Soberón-Chávez *et al.*, 2005.

1.5. El sistema Pqs

El sistema Pqs está conformado por la proteína reguladora PqsR y las moléculas señal de este sistema son alquil-quinolonas (2-alquil-4(1H)-quinolonas) (AQs), específicamente las que son capaces de interaccionar y activar a PqsR son la 4-hidroxi-2-heptilquinolona (HHQ) y la 2-heptil-3,4-dihidroxiquinolona (PQS). Estas AQs son sintetizadas por las proteínas codificadas

en el operones *pqsABCDE*, *phnAB* y por el gen *pqsH* que se encarga de catalizar la conversión de HHQ en PQS (García-Reyes *et al.*, 2020). Este sistema regula la transcripción de al menos 35 *loci* entre los que destacan los operones *pqsABCDE*, *phnAB* y genes de respuesta al estrés oxidativo (Cao *et al.*, 2001; Maura *et al.*, 2016).

La principal aportación de este sistema a la regulación de factores de virulencia es a través de la modulación de la actividad del sistema Rhl, ya que la inactivación de PqsR afecta fenotipos dependientes de dicho sistema, especialmente piocianina (Cao *et al.*, 2001; Farrow *et al.*, 2008). Sin embargo, esta modulación no es realizada por el complejo PqsR-PQS/HHQ, sino por la proteína PqsE codificada en el operón *pqsABCDE*, la ausencia de PqsE afecta la producción de piocianina sin afectar la síntesis de AQS (Gallagher *et al.*, 2002). Se ha sugerido que PqsE funciona como una sintasa de un autoinductor desconocido que podría interactuar con RhlR, propiciando la activación de sus genes blanco (Mukherjee *et al.*, 2018), sin embargo, esta hipótesis no ha sido soportada en subsecuentes investigaciones (Groleau *et al.*, 2020), y recientemente se sugirió que PqsE podría interactuar directamente con RhlR para favorecer su actividad (Taylor *et al.*, 2021).

1.6. Relación entre los sistemas de *quorum sensing*

Como se mencionó anteriormente, una característica importante de los sistemas de QS es que presentan un circuito de autorregulación positivo, lo cual permite que se amplifique su señal una vez que se ha activado el sistema. En el caso del sistema Las, el complejo LasR/3-O-C12-HSL activa la transcripción de *lasI* promoviendo así la síntesis de la molécula señal de este sistema (Latifi *et al.*, 1996). En el caso del sistema Rhl, el complejo RhlR/C4-HSL es capaz de promover la transcripción del operón *rhlABRI* donde se encuentran codificadas RhlR y RhlI (Morales *et al.*, 2017). En cuanto al sistema Pqs, es el complejo PqsR-PQS/HHQ el que activa directamente la transcripción del operón *pqsABCDE* (Wade *et al.*, 2005).

Además de esta autorregulación, los sistemas de QS de *P. aeruginosa* también presentan interregulación. El elemento característico de esta interregulación, es la relación jerárquica que presenta el sistema Las sobre los otros dos sistemas. Específicamente, Las regula al sistema

Rhl de dos formas: (I) activando la transcripción de *rhlR* (Latifi *et al.*, 1996; Pesci *et al.*, 1997) , y (II) activando la transcripción de *rhlI* incluso de manera dominante a la activación dada por el sistema Rhl (de Kievit *et al.*, 2002). Mientras tanto, el sistema Las también ejerce control sobre el sistema Pqs de dos maneras: (I) regula positivamente a *pqsH* quien participa en la síntesis de PQS (Gallagher *et al.*, 2002), (II) la transcripción de PqsR, la proteína reguladora del sistema, también es regulada por LasR (Wade *et al.*, 2005), estableciendo así una relación estrecha entre los sistemas de QS dependientes de AHLs y el sistema Pqs. Con dichas evidencias el sistema Las se propuso como el regulador principal del QS.

En el caso del sistema Rhl, éste ejerce regulación negativa sobre el sistema Pqs de dos maneras: (I) regula negativamente la transcripción de *pqsR* (Wade *et al.*, 2005), y (II) regula de manera negativa la traducción de *pqsABCDE*, ya que promueve la transcripción de este operón desde un promotor distal que provoca la síntesis de una isoforma de mRNA que no es capaz de traducirse (Brouwer *et al.*, 2014).

Finalmente, como se explicó a detalle con anterioridad, el sistema Pqs se considera un regulador positivo del sistema Rhl, ya que al inactivar al sistema Pqs se afectan los fenotipos dependientes del sistema Rhl (Diggle *et al.*, 2003). De esta manera los tres sistemas de QS muestran regulación entre sí, creando una red regulatoria compleja (Fig. 1.1).

1.7. Factores de virulencia regulados por *quorum sensing*

P. aeruginosa es considerada un patógeno con gran capacidad de causar daño en el hospedero, debido a la gran cantidad de factores de virulencia que es capaz de producir, entre ellos exotoxinas, proteasas, fosfolipasas, lectinas y fenazinas. En este apartado se detallará sobre tres factores de virulencia que son regulados por QS y que además son considerados de gran importancia al momento de establecer una infección.

La piocianina es una fenazina producida por *P. aeruginosa*, ésta es la responsable del color característico verde-azul que se suele observar en los cultivos de esta especie. Es considerada un factor de virulencia debido a que provoca interferencia en el transporte de iones y producción de secreciones mucosas (Denning *et al.*, 1998), no obstante, se considera que

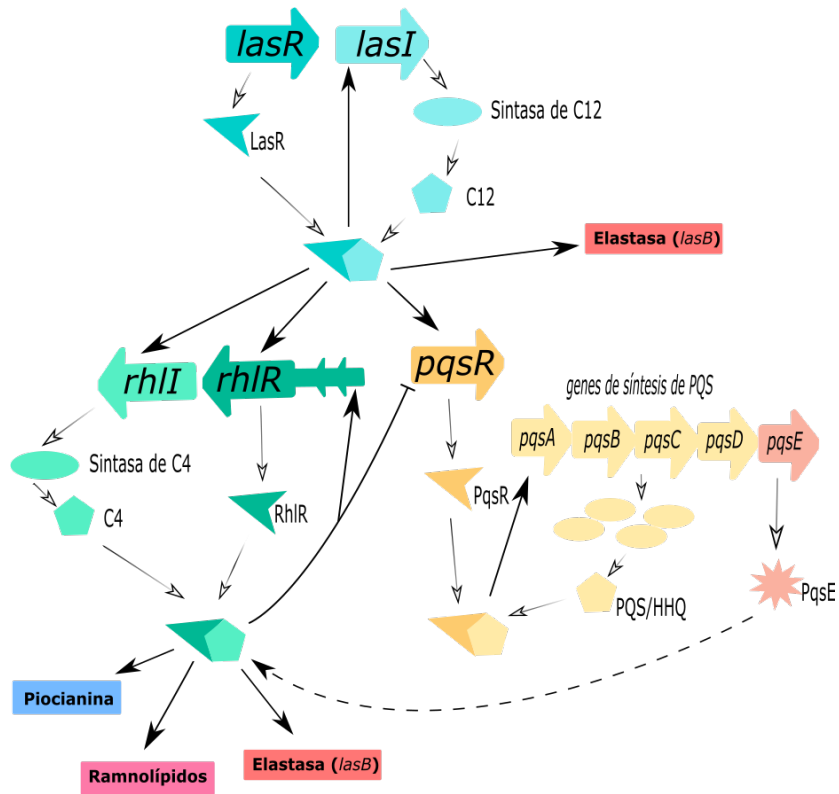


Figura 1.1: Los sistemas de *quorum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa*. Los genes son representados como flechas de colores indicando su dirección en el genoma, las proteínas y moléculas señal son representadas con figuras de colores, las flechas con punta negra indican regulación positiva, mientras que las líneas con punta perpendicular indican regulación negativa, líneas continuas indican regulación directa, mientras las líneas punteadas indican que el mecanismo de regulación no ha sido determinado con exactitud. C12: 3-O-C12-HSL, C4: C4-HSL.

su principal actividad radica en la participación en reacciones de oxido-reducción provocando acumulación de superóxido y peróxido de hidrógeno lo que desencadena estrés oxidativo (Britigan *et al.*, 1997). La piocianina es sintetizada por un grupo de enzimas codificadas por dos operones denominados *phzA1B1C1D1E1F1G1* y *phzA2B2C2D2E2F2G2* y dos genes adicionales *phzM* y *phzS* (Mavrodi *et al.*, 2001). El complejo RhlR/C4-HSL regula positivamente la transcripción de ambos operones (Jimenez *et al.*, 2012; Higgins *et al.*, 2018), aunque solamente se ha identificado la presencia de una caja *las-rhl* en la región reguladora del operón *phzA1* (Whiteley y Greenberg, 2001). Debido a que la síntesis de este factor de virulencia es afectada por los tres sistemas de QS, es considerado un excelente fenotipo indicador del estatus de los sistemas de QS.

La elastasa LasB es considerada la exoproteasa predominante en *P. aeruginosa*, es capaz de hidrolizar gran cantidad de proteínas del hospedero provocando daño en los tejidos, además de alterar la respuesta inmune y promover inflamación (Galdino *et al.*, 2019). Fue el primer gen descrito como blanco de regulación de LasR (Gambello y Iglewski, 1991) y se ha comprobado la presencia de dos cajas *las-rhl* y la interacción directa de LasR con éstas (Rust *et al.*, 1996; Schuster *et al.*, 2004) (Gilbert *et al.*, 2009). Sin embargo, *lasB* también es regulado positivamente por el sistema Rhl y es necesaria la presencia de ambos sistemas para que su síntesis alcance los niveles óptimos (Soto-Aceves *et al.*, 2019).

Los ramnolípidos son biosurfactantes producidos por algunas bacterias, incluida *P. aeruginosa*, son considerados biomoléculas con potencial biotecnológico (Soberón-Chávez *et al.*, 2021), sin embargo, en el contexto de la infección se consideran factores de virulencia ya que están relacionados con la formación de biopelícula (Davey *et al.*, 2003), la movilidad tipo *swarming* (Caiazza *et al.*, 2005) y afectan el transporte mucociliar en el epitelio respiratorio del hospedero (Read *et al.*, 1992). La regulación de la síntesis de los ramnolípidos depende directamente del sistema Rhl, específicamente, RhlR/C4-HSL activa la transcripción del operón *rhlAB* y el gen *rhlC*, encargados de la síntesis de ramnolípidos.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1. ¿Por qué estudiar condiciones de bajo fosfato?

El fosfato es esencial para toda célula debido a su función como componente de biomoléculas primordiales como los nucleótidos y los fosfolípidos, además de participar en la transducción de señales mediante la fosforilación. La importancia de estudiar el sistema de QS en condiciones de bajo fosfato radica principalmente en que las concentraciones de fosfato disponible en el hospedero son consideradas bajas (1.12-1.45 mM) (Bansal, 1990), ya que para *P. aeruginosa* se consideran concentraciones óptimas de fosfato alrededor de 4 mM (Gallarato *et al.*, 2014). Esta condición se intensifica en tejidos con reciente cirugía o pacientes que recibieron quimioterapia generando una condición de hipofosfatemia (<0.3-0.4 mM), esto promovería un fenotipo agresivo por parte de *P. aeruginosa* en infecciones intrahospitalarias (Long *et al.*, 2008; Markou y Apidianakis, 2013). Por lo anterior, el estrés por bajo fosfato se trata de una condición común en ambientes donde la bacteria establece infecciones.

P. aeruginosa ha desarrollado mecanismos que le permiten sobrevivir en ambientes con poca disponibilidad de fosfatos. Por ejemplo, se ha reportado que en esta condición se incrementa el movimiento bacteriano tipo *swarming* a través de la sobreproducción de ramnolípidos lo que le confiere al organismo la capacidad de desplazarse hasta encontrar un nicho adecuado para su desarrollo óptimo (Bains *et al.*, 2012). Sin embargo, la producción de ramnolípidos no es el único factor de virulencia que se sobreexpresa en condiciones de bajo

fosfato, como se mencionó anteriormente, la producción general de varios factores de virulencia dependientes del sistema de QS está aumentada, llegándose a considerar como una condición potenciadora de la expresión de un fenotipo letal en *Pseudomonas aeruginosa* (Zaborin *et al.*, 2009). Lo anterior sumado a la resistencia intrínseca a gran variedad de antibióticos que presenta la especie hace aún más difícil combatir la infección generada. Bajo esta premisa se han propuesto enfoques en los que el suministro de fosfato a la zona afectada puede ayudar a disminuir los efectos de la infección facilitando así la recuperación (Mohammadi-Samani *et al.*, 2016). En este contexto, es de particular interés determinar cómo se regula la expresión de los genes involucrados en los sistemas de QS en condición de bajo fosfato para poder desarrollar tratamientos más efectivos contra *P. aeruginosa*.

2.2. Los sistemas de QS de *P. aeruginosa* en condiciones de bajo fosfato

Como se mencionó anteriormente, existen varios reportes en los que se ha observado que en condiciones de bajo fosfato la producción de factores de virulencia regulados por QS en *P. aeruginosa* se ve aumentada (Jensen *et al.*, 2006; Zaborin *et al.*, 2009; Bains *et al.*, 2012), por lo que es necesario evaluar lo que sucede con dichos sistemas. Específicamente, en el caso del sistema Rhl se demostró que su transcripción es mayor en medio deficiente de fosfatos (Jensen *et al.*, 2006), además en estas condiciones se detecta la expresión de *rhlR* a partir de cuatro transcritos diferentes, mientras en medio rico solamente se encuentra un transcrito (Medina, Juarez, *et al.*, 2003).

El sistema Pqs también podría desempeñar un papel importante en estas condiciones debido a que su actividad como regulador se ha visto estrechamente ligada a la respuesta del sistema Rhl. Además se ha reportado un incremento en la producción de Aqs en condiciones de bajo fosfato (Jensen *et al.*, 2006).

Con respecto al sistema Las, no se ha determinado su participación en este fenotipo de sobreproducción de factores de virulencia en condiciones con bajo fosfato disponible y si su función como regulador principal de la jerarquía de QS se mantiene.

2.3. El sistema PhoB-PhoR

Una explicación para el fenómeno de sobreproducción de factores de virulencia, podría ser atribuida al regulador transcripcional PhoB, esta proteína forma parte de un sistema de doble componente PhoR-PhoB activado en respuesta a bajos niveles de fosfato. En *Escherichia coli*, PhoR fosforila a PhoB quien activa la transcripción de sus genes blanco los cuales presentan en su región regulatoria una secuencia conocida como caja *pho*. En *P. aeruginosa* el sistema *pho* ha sido descrito y se ha reportado la existencia de secuencias parecidas a las cajas *pho* descritas para *E. coli* en la región reguladora de *rhlR* e incluso en otros genes relacionados con el QS y los factores de virulencia como son *rhlI*, *phzA1/A2* y *pqsR* (Jensen *et al.*, 2006; Bains *et al.*, 2012). Sin embargo la posible interacción de PhoB con las cajas putativas no ha sido demostrada directamente.

Lo anterior deja un escenario muy interesante por resolver como es el determinar si el sistema Las sigue controlando a los demás sistemas en estas condiciones, determinar si existe una jerarquía de QS y si es el caso elucidar qué sistema se encuentra en la cima de la cascada regulatoria, adicionalmente, identificar qué genes relacionados con el QS son regulados por PhoB y cómo es dicha regulación. Debido a que el panorama aún es poco claro, es necesario determinar cómo es la relación entre los sistemas de QS en condiciones donde el fosfato es limitante.

Capítulo 3

Objetivos

3.1. Objetivo general

Determinar la dinámica regulatoria de los sistemas de QS en condiciones de crecimiento con bajas concentraciones de fosfato en *Pseudomonas aeruginosa*.

3.1.1. Objetivos particulares

1.- Cuantificar la síntesis de los factores de virulencia dependientes de QS en alto y bajo fosfato.

2.- Determinar la relevancia de cada uno de los sistemas de QS en la síntesis de los factores de virulencia en alto y bajo fosfato.

3.- Determinar si la expresión de los sistemas de QS se ve afectada por la disponibilidad de fosfato.

4.- Determinar si la proteína PhoB regula a los sistemas de QS.

Capítulo 4

Material y métodos

4.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

La información sobre cepas, plásmidos, y oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo se encuentran en las tablas 4.1, 4.2 y 4.3. Las secuencias genéticas de *P. aeruginosa* usadas como referencia y en las figuras del presente trabajo fueron obtenidas de la base de datos pseudomonas.com (Winsor *et al.*, 2016).

Cepa	Descripción	Referencia
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Cepa de referencia. Aislado clínico.	(Holloway, 1955)
PAO1 Δ <i>lasR</i>	Derivada de PAO1, mutante <i>lasR</i> . Tc ^R .	(Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2019)
PAO1 Δ <i>rhlR</i>	Derivada de PAO1, mutante <i>rhlR</i> . Sm ^R .	(Morales <i>et al.</i> , 2017)
PAO1 Δ <i>pqsR</i>	Derivada de PAO1, mutante <i>pqsR</i> .	(Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)

Continúa en la página siguiente.

Cepa	Descripción	Referencia
PAO1 Δ <i>phoB</i>	Derivada de PAO1, mutante <i>phoB</i> .	Este trabajo (Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)
PAO1 Δ <i>phoB</i> -PB	Derivada de PAO1 Δ <i>phoB</i> , complementada con el plásmido p20PB. Cb ^R .	Este trabajo (Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)
P-PBX	Derivada de PAO1 con plásmido pMPBX integrado en cromosoma. Tc ^R	Este trabajo (Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)
P-RRX	Derivada de PAO1 con plásmido pMRRX integrado en cromosoma. Tc ^R	Este trabajo (Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)
PB-RRX	Derivada de PAO1 Δ <i>phoB</i> con plásmido pM-RRX integrado en cromosoma. Tc ^R	Este trabajo (Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)
PBc-RRX	Derivada de PAO1 Δ <i>phoB</i> complementada con el plásmido p20PB. Con plásmido pM-RRX integrado en cromosoma. Cb ^R , Tc ^R .	Este trabajo (Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)
P-LRZ	Derivada de PAO1 con plásmido pSLR. Sm ^R .	(Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2019)
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Cepa no patógena desarrollada para clonación.	(Hanahan, 1983)

Tabla 4.1: Cepas utilizadas en el presente trabajo. Tc: tetraciclina, Sm: estreptomycin, Cb: carbenicilina. ^R: Resistencia

Plásmido	Descripción	Referencia
pJET1.2/blunt	Vector de clonación de productos de PCR. Amp ^R .	ThermoScientific
pEX18Gm	Vector para reemplazo de genes por recombinación en <i>P. aeruginosa</i> . Gm ^R	(Hoang <i>et al.</i> , 1998)
pIJ773	Plásmido con el gen aac(3)IV que confiere resistencia a apramicina. Apra ^R .	(Gust <i>et al.</i> , 2004)
pXPBa	Plásmido derivado del pEX18Gm conteniendo phoB::Apra para inducir sustitución de <i>phoB</i> por el gen de resistencia a apramicina. Apra ^R .	Este trabajo (Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)
pUCP20	Vector de clonación para <i>Escherichia</i> y <i>Pseudomonas</i> . Cb ^R .	(Olsen <i>et al.</i> , 1982)
p20PB	Plásmido derivado del pUCP20 con <i>phoB</i> bajo el control de P _{lac} . Cb ^R .	Este trabajo (Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)
mini-CTX- <i>lux</i>	Plásmido integrativo en <i>P. aeruginosa</i> para generar fusiones transcripcionales con el operón <i>lux</i> de <i>Xenorhabdus luminescens</i> como gen reportero. Tc ^R .	(Becher y Schweizer, 2000)
pMRRX	Vector derivado del mini-CTX- <i>lux</i> con fusión transcripcional del promotor del gen <i>rhlR</i> . Tc ^R .	Este trabajo (Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)
pMPBX	Vector derivado del mini-CTX- <i>lux</i> con fusión transcripcional del promotor del gen <i>phoB</i> . Tc ^R .	Este trabajo (Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)
pSEVA421	Vector de clonación. Sm ^R .	(Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013)
pSLR	Plásmido derivado del pSEVA421 conteniendo fusión <i>lasR</i> ' <i>lacZ</i> . Sm ^R .	(Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2019)

Continúa en la página siguiente.

Plásmido	Descripción	Referencia
pLP170	Vector para construcción de fusiones transcripcionales con <i>lacZ</i> como gen reportero. Amp ^R .	(Preston <i>et al.</i> , 1997)
pLZA1z	Plásmido derivado del pLP170 conteniendo la región promotora de <i>phzA1</i> generando la fusión <i>phzA1'lacZ</i> . Amp ^R .	Este trabajo (Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)
pLZA2z	Plásmido derivado del pLP170 conteniendo la región promotora de <i>phzA2</i> generando la fusión <i>phzA2'lacZ</i> . Amp ^R .	Este trabajo (Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)
pET21a	Vector de expresión de proteínas con etiqueta de histidinas (His6). Resistencia a Amp ^R .	Novagen
pETPB	Vector derivado el pET21a para expresión de PhoB. Amp ^R	Este trabajo (Soto-Aceves <i>et al.</i> , 2021)

Tabla 4.2: Plásmidos utilizados en el presente trabajo. Amp: ampicilina, Gm: gentamicina, Apra: apramicina, Tc: tetraciclina, Sm: estreptomicina, Cb: carbenicilina. ^R: Resistencia

Número identificador	Región que amplifica	Secuencia 5'-3'
6824	Región río arriba de <i>phoB</i> . Fw.	TACAAAAAAGCAGGCTAGGCTTCTTGTCCTGGATG
6825	Región río arriba de <i>phoB</i> . Rv.	GTCGACGGATCCCCGGAATAGGATTGTCTTGCCAACCAT
6826	Región río abajo de <i>phoB</i> . Fw.	GAAGCAGCTCCAGCCTACATTCTCCACCAAGAGCTGAC
6827	Región río abajo de <i>phoB</i> . Rv.	TACAAGAAAGCTGGGTCACCGTCCTGCGGGGTCTTC

Continúa en la página siguiente.

Número identificador	Región que am- plifica	Secuencia 5'-3'
9522	Gen de resistencia a apramicina. Fw.	TATTCCGGGGATCCGTCCGAC
9523	Gen de resistencia a apramicina. Rv.	TGTAGGCTGGAGCTGCTTC
3861	Región codificante de <i>phoB</i> . Fw.	AAAAAGACCATGGTTGGCAAGACAATCCTCATC
3862	Región codificante de <i>phoB</i> . Rv.	AAAAAAGCTTGGTCAGCTCTTGGTGGAGAAACG
1300	Región reguladora de <i>rhlR</i> . Fw.	GCGAAGCTTGAGCCTTGCTGCCATCGT
1301	Región reguladora de <i>rhlR</i> . Rv.	GAACTGCAGTCGATAAAATGCATCACAGCA
2814	Región reguladora de <i>phoB</i> . Fw.	GCGAAGCTTATAAAGGGGCTTGCCGTAGT
2815	Región reguladora de <i>phoB</i> . Rv.	GAACTGCAGGTCGATCTGTCTTGCGCCGC
607	Región reguladora de <i>phzA1</i> . Fw.	CACCTCGAGCAGAGCCTTTTCCTGCGTACC
608	Región reguladora de <i>phzA1</i> . Rv.	CACAAGCTTGAAACTTTCCCTCGCGGCAT
613	Región reguladora de <i>phzA2</i> . Fw.	CACCTCGAGCTCAACTGAATCGACGCCTC
614	Región reguladora de <i>phzA2</i> . Rv.	CACGGATCCGAATCGACTGGCATCCATAC
4602	Región dentro de <i>pqsD</i> . Fw.	AAAAACTCGAGCCGAAACGCCAGGTCAGC

Continúa en la página siguiente.

Número identificador	Región que amplifica	Secuencia 5'-3'
4603	Región dentro de <i>pqsD</i> . Rv.	AAAAGCTTAGTCCATGCGCTTGGACAG
8057	Región codificante de <i>phoB</i> . Fw.	CGGGATCCATGGTTGGCAAGACAATCCT
8058	Región codificante de <i>phoB</i> . Rv.	CCCAAGCTTGCTCTTGGTGGAGAAACGAT
8598	Región dentro de <i>pqsE</i> . Fw.	TTGAGGCTTTCGGCTCCC
2492	Región dentro de <i>pqsE</i> . Rv.	CCAAGCTTGGATGTCCCGTCTCAGTC
5648	Región dentro de <i>rpsL</i> . Fw.	TGGTGGCGGTCCAGTAGTA
5649	Región dentro de <i>rpsL</i> . Rv.	ACTACGCTGTGCTCTTGACAG

Tabla 4.3: Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo. Fw: oligonucleótido *forward* (directo), Rv: oligonucleótido *reverse* (inverso). Se resalta en negritas la secuencia que aparece con el genoma, la parte restante corresponde a sitios de restricción y/o adaptadores según el caso.

4.2. Condiciones de cultivo de las cepas

Los pre-cultivos de las cepas de *P. aeruginosa* y de *E. coli* se realizaron en medio LB, cuya composición es (g/L): 10 de cloruro de sodio, 10 de triptona de caseína y 5 de extracto de levadura. Las concentraciones de antibióticos usadas para *P. aeruginosa* fueron ($\mu\text{g/mL}$): apramicina (Apra) 100, carbenicilina (Cb) 200, tetraciclina (Tc) 120, gentamicina (Gm) 100,

estreptomomicina (Sm) 200. Las concentraciones usadas para *E. coli* fueron ($\mu\text{g}/\text{mL}$): tetraciclina (Tc) 15, carbenicilina (Cb) 200. Los pre-cultivos fueron incubados a 37°C , con agitación a 225 rpm por 16 horas.

Para la cuantificación de factores de virulencia (piocianina, ramnolípidos y actividad elastolítica), las mediciones de actividad de las fusiones transcripcionales y la extracción de RNA de las cepas de *P. aeruginosa*, se utilizaron los medios FDS (bajo en fosfato) y FDS+ (alto en fosfato). El medio FDS contiene: 1% de D-L alanina, 2% de Glicerol, 0.5mM de K_2HPO_4 , 20mM de MgCl_2 , 0.1M de Na_2SO_4 y $50\mu\text{M}$ de citrato de hierro. Mientras en el medio FDS+, solo se modifica la concentración de K_2HPO_4 quedando en 4.5 mM. Los cultivos en medios FDS y FDS+ se llevaron a cabo en matraces de 125 mL con 30 mL de medio y se incubaron a 37°C con agitación a 225 rpm, fueron inoculados con células provenientes de un pre-cultivo en medio LB, estas fueron lavadas y se inoculó a una D.O. de 0.1 a 600 nm.

4.3. Extracción y manipulación de DNA

Para la extracción de DNA cromosomal se utilizó el kit DNeasy Blood and Tissue (Qia-gen), para DNA plasmídico el kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), y para la purificación de productos de PCR el kit PCR Purification (Jena Bioscience); siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los procedimientos para la manipulación de DNA se realizaron según lo descrito por Maniatis y colaboradores (Maniatis *et al.*, 1982). Las enzimas de restricción utilizadas son de New England BioLabs. Para las ligaciones se utilizó la T4 DNA ligasa (Promega). Para las reacciones de PCR se utilizó la enzima DNA polimerasa *Phusion High-Fidelity* (Thermo Fisher Scientific).

4.4. Protocolo de transformación

La transformación de *P. aeruginosa* se llevó a cabo siguiendo el protocolo de electroporación (Filloux y Ramos, 2014). En síntesis: 1 mL de células provenientes de un cultivo de 16 horas en medio LB se lavan con una solución de sacarosa al 10% fría, se mezclan $80\mu\text{L}$ de suspensión celular con hasta $10\mu\text{L}$ del DNA a una concentración de 0.1-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y se

electroporó utilizando un equipo MicroPulser de Bio-Rad. La selección de cepas transformantes se llevó a cabo en cajas de medio sólido con el antibiótico de selección correspondiente y fueron incubadas por 16-20 h a 37°C.

En el caso de *E. coli* se utilizó el protocolo para preparación de células competentes (Chung *et al.*, 1989), las cuales fueron transformadas por choque térmico. La selección de cepas transformantes se llevó a cabo en medio sólido con el antibiótico de selección en cajas incubadas por 16-20 h a 37°C.

4.5. Generación de mutante en *phoB* en *P. aeruginosa*

Para la construcción de la mutante en *phoB* se utilizó el método reportado por Choi, *et al.* (Choi y Schweizer, 2005) que se basa en la sustitución del gen blanco por doble recombinación homóloga. Las regiones río arriba y río abajo del gen *phoB* fueron obtenidas por PCR utilizando los oligonucleótidos 6824 - 6825 y 6826 - 6827, respectivamente. Los oligonucleótidos 9522 - 9523 fueron utilizados para obtener el cassette de resistencia a apramicina del plásmido pIJ773 (Gust *et al.*, 2004). Los tres amplicones fueron unidos por PCR y luego clonados en el plásmido pEXGm18, obteniendo así el plásmido pXPBa utilizado para generar la mutante en *PhoB*.

Para complementar la mutante, se construyó el plásmido p20PB de la siguiente manera: La región codificante del gen *phoB* fue amplificada con los oligos 3861 y 3862 y el producto obtenido se clonó en el plásmido pJET1.2/blunt. Posteriormente se subclonó en el plásmido pUCP20 en los sitios de restricción XbaI y HindIII.

4.6. Construcción de fusiones transcripcionales

Para construir las fusiones transcripcionales pMRRX y pMPBX, las regiones promotoras de los genes *rhlR* y *phoB* fueron amplificadas por PCR utilizando los oligonucleótidos 1300 - 1301 y 2814 - 2815, respectivamente. Los productos de PCR fueron digeridos con HindIII y PstI y clonados en el plásmido mini-CTX-*lux* previamente digerido con las mismas enzimas.

Los plásmidos resultantes fueron verificados por PCR y secuencia para comprobar que la polimerasa no introdujera cambios.

Las fusiones *lacZ* de *phzA1* y *phzA2* se construyeron amplificando la región promotora de cada gen con los oligos 607-608 y 613-614, respectivamente. Los productos de PCR fueron clonados en los sitios XhoI-HindIII y XhoI-BamHI, respectivamente, en el plásmido pLP170. Los plásmidos resultantes se denominaron pLZA1z y pLZA2z. Los plásmidos resultantes fueron verificados por PCR y secuencia para comprobar que la polimerasa no introdujera cambios.

4.7. Medición de actividad de fusiones *lux* y *lacZ*

La medición de luminiscencia de las cepas que contienen fusiones con el operón *lux* se realizó en placas de 96 pozos negras con fondo transparente (Greiner Bio-one) en el equipo Synergy HT (BioTek). Los cultivos fueron crecidos en matraces como se indica en la sección *Condiciones de cultivo de las cepas*, para cada medición se utilizan 200 μL de cultivo para ser cargado y leído en la placa. Las unidades relativas de luminiscencia (U.R.L.) se dividen entre la D.O._{630nm}, ambos valores son arrojados por el equipo. Se realizaron 3 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas de cada experimento.

La medición de actividad β -galactosidasa fue realizada siguiendo los protocolos estándar (J. H. Miller, 1972), en síntesis; se obtuvieron por centrifugación las células de 1 mL del cultivo y se resuspendieron en 1 mL de Buffer Z, se midió la D.O._{600nm} de dicha suspensión y se tomaron 100 μL de dichas células para ser agregados al tubo de reacción. En el tubo de reacción además se agregaron 900 μL de Buffer Z, 20 μL de cloroformo, 20 μL de SDS al 10% y 100 μL de solución de ONPG (8 mg/mL), se mezcló y la reacción se dejó actuar por 4 min en el caso de *lasR'lacZ* (pSLR) y 1 min en el caso de *phzA1/2* (pLZA1z y pLZA2z). La reacción se detuvo con 500 μL de solución 1M de Na_2CO_3 . Como control se realiza la misma reacción pero en vez de añadir 100 μL de células, se añaden 100 μL de Buffer Z. Se mide la absorbancia a 420 y 550 nm. Las unidades Miller se calculan con la siguiente formula:

$$(1000*(D.O._{420nm}-(1.75*D.O._{550nm}))) / (t*v*D.O._{600nm})$$

Donde t= tiempo de reacción en minutos y v=volumen utilizado de células en suspen-

sión (en este caso 100 μL). Se realizaron 3 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas de cada experimento.

4.8. Cuantificación de factores de virulencia

La medición de piocianina, actividad elastolítica y ramnolípidos se llevó a cabo partiendo de cultivos crecidos por 24 horas en las condiciones especificadas en la sección *Condiciones de cultivo de las cepas*. Se centrifugó el cultivo a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante fue colectado y mantenido en hielo.

Para la medición de piocianina se utilizó el protocolo de extracción con cloroformo previamente reportado (Essar *et al.*, 1990), la concentración obtenida en $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue dividida entre la D.O._{600nm}. Se realizaron 3 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas de cada experimento.

Para la actividad elastolítica, se utilizó un protocolo modificado del reportado previamente (Beatson *et al.*, 2002); en síntesis, se toman 5 mg de elastina-rojo congo (Sigma) y se agregan 850 μL de buffer de reacción que contiene: Tris-HCl (pH 7.5) al 20 mM y CaCl_2 1 mM, finalmente se agregan 150 μL del sobrenadante y se incuba a 37°C por 3 h, pasado el tiempo se realiza medición en espectrofotómetro a 495 nm. La absorbancia obtenida fue dividida entre la D.O._{600nm}. Se realizaron 4 réplicas técnicas y 3 réplicas biológicas de cada experimento.

Los ramnolípidos se extrajeron con cloroformo-metanol y se corrieron en cromatografía de capa fina usando una fase móvil de metanol-ácido acético siguiendo el protocolo reportado previamente (Matsuyama *et al.*, 1987). Se realizaron 3 réplicas biológicas, la imagen mostrada en el presente trabajo es representativa de las réplicas realizadas.

4.9. Ensayo de Movilidad Electroforética (EMSA)

La región promotora del gen *rhlR* fue obtenida por PCR utilizando los oligos 1300 y 1301. Este fragmento (460 pb) contiene los cuatro promotores reportados y la posible caja *pho*. El promotor de *phoB* utilizado como control positivo, fue obtenido utilizando los oligos

2814 y 2815. El fragmento utilizado como control negativo se obtuvo usando los oligos 4602 y 4603, los cuales amplifican un fragmento de 407 pb dentro del gen *pqsD*. Para expresar la proteína PhoB se generó el plásmido pETPB, el cual fue construido de la siguiente manera: Se clonó la secuencia estructural de *phoB* en los sitios BamHI y HindIII del plásmido pET21a (Novagene), la secuencia estructural de *phoB* se obtuvo con los oligos 8057 y 8058. PhoB-His fue purificada usando el *nickel-nitrilotriacetic acid spin kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor. El fragmento de DNA y las proteína PhoB purificada fueron incubados usando un buffer y protocolo previamente reportados (Bielecki *et al.*, 2015), se usaron 80 ng de DNA y 0, 10 y 15 μ M de PhoB. Las reacciones fueron incubadas a temperatura ambiente por 30 min. La electroforesis se realizó en geles nativos de poliacrilamida al 6% en Buffer TBE 1x (Tris Base 0.13 M, Ácido bórico 45 mM, EDTA 2.5 mM, pH 8) a 10 mA por 2 horas a 4°C. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz UV.

4.10. Extracción y secuenciación de RNA

La extracción de RNA se realizó a partir de tres cultivos independientes de la cepas PAO1 y su mutante en *lasR* crecidas en medio FDS y FDS+ por 22 horas. Las células fueron recuperadas por centrifugación y la extracción de RNA se llevó a cabo siguiendo el protocolo de *TRIzol* (Invitrogen), para después ser tratados con DNasa I libre de RNAsas (Thermo Fisher) hasta que no hubiera DNA detectable por PCR, siguiendo un programa de 30 ciclos con los oligos 8598 y 2492. La integridad del RNA fue analizada por electroforesis en gel de agarosa al 1% con hipoclorito de sodio al 1%. El RNA ribosomal fue eliminado por hibridización utilizando *RiboMinus transcriptome isolation kit-bacteria* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del proveedor. Las bibliotecas de mRNA para cada uno de los tres cultivos independientes de cada cepa/condición fueron construidas usando *TrueSeq stranded mRNA library preparation kit* (Illumina) y fueron secuenciadas en el equipo *Illumina NextSeq 500* con más de 10,000,000 lecturas pareadas por muestra. La expresión diferencial fue evaluada con los paquetes DESeq2 1.11.1 (Love *et al.*, 2014), EdgeR 3.24.1 (Robinson *et al.*, 2011) y limma-vomm 3.38.5 (Ritchie *et al.*, 2015). Las gráficas y tablas de expresión diferencial mostradas corresponden a las obtenidas con el paquete DESeq2. Los

genes fueron considerados como diferencialmente expresados cuando mostraron un valor de \log_2 *Fold Change* (*veces que más se expresa*) arriba de 1 y un valor p y p ajustado debajo de 0.05. Para la integración de los análisis y la generación de gráficas se utilizó el servidor IDEAMEX (Jiménez-Jacinto *et al.*, 2019).

4.11. Retrotranscripción - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Para la reacción de retrotranscripción se utilizaron 500 ng de RNA previamente tratado con DNAsa (como se indicó en el apartado *Extracción y secuenciación de RNA*), se utilizó la enzima retrotranscriptasa *RevertAid* (Thermo Fisher Scientific) y los oligonucleótidos *reverse* de *pqsE* (2492) y *rpsL* (5649). Para la reacción de PCR punto final se utilizaron 75 ng del DNA complementario (cDNA) y los oligos 8598-2492 y 5648-5649, para *pqsE* y *rpsL*, respectivamente. La electroforesis de las muestras se realizó en gel de agarosa al 0.1 % en buffer TAE 1x (Tris-acetato 0.4 M, EDTA 0.01 M, pH 8). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en luz UV.

Capítulo 5

Resultados

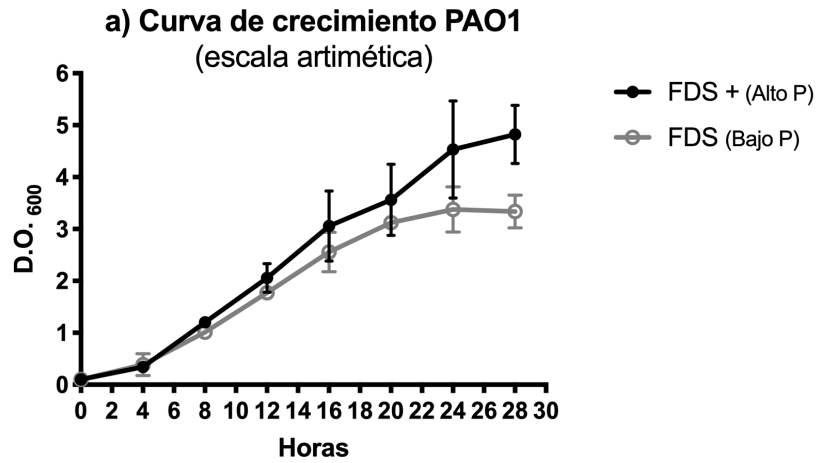
5.1. Producción de factores de virulencia en bajo fosfato

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar los sistemas de QS en condiciones de bajo fosfato, para esto se utilizó un medio de cultivo basado en el previamente reportado (Frank y DeMoss, 1959) que ha sido utilizado en estudios previos en *P. aeruginosa* (Jensen *et al.*, 2006). El medio contiene K_2HPO_4 como fuente definida de fosfato, en este caso se utilizó 0.5 mM en el medio bajo en fosfato (FDS) y a 4.5 mM en la condición de alto fosfato (FDS+) (la formulación completa de los medios se encuentra en la sección *Material y Métodos*). El crecimiento de la cepa PAO1 (cepa de referencia) es muy similar en ambos medios sin mostrar diferencias de crecimiento significativas (Fig. 5.1).

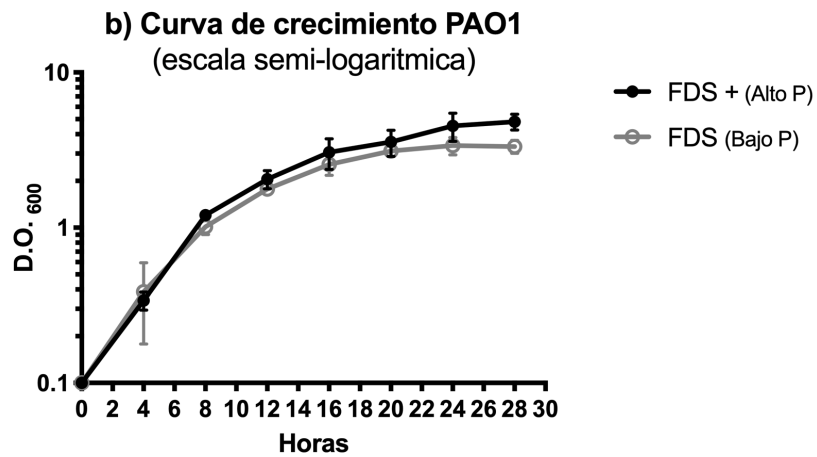
Con el objetivo de determinar el fenotipo de la cepa PAO1 en condiciones de alto y bajo fosfato. Se midió la producción de piocianina en los medios FDS y FDS+. Coincidiendo con reportes previos (Jensen *et al.*, 2006; Zaborin *et al.*, 2009), se observó mayor producción de piocianina en el crecimiento en medio FDS (bajo fosfato). Esto es visible desde las 16 horas, momento en el que inicia la fase estacionaria (Fig. 5.2 a) y siendo más acentuado a las 24 horas (Fig. 5.2 b).

Para determinar si este fenómeno de sobreproducción de piocianina también sucede con otro fenotipo dependiente de QS, se analizó la producción de ramnolípidos, la detección se

realizó por cromatografía de capa fina (Fig. 5.3). Al igual que la piocianina, se observó mayor producción de ramnolípidos en medio FDS, este resultado correlaciona con un estudio previo en el que se reportó que en bajo fosfato aumenta el movimiento tipo *swarming* ya que este tipo de motilidad está estrechamente relacionada con la producción de ramnolípidos (Blus-Kadosh *et al.*, 2013).



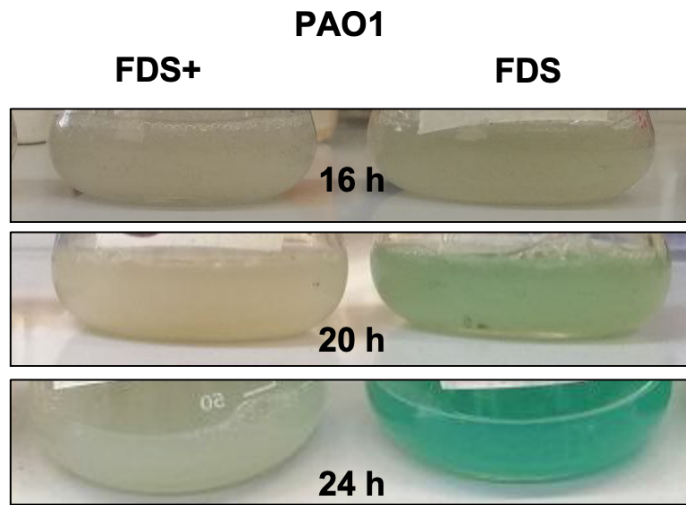
(a) Curva graficada en escala aritmética



(b) Curva graficada en escala semi-logarítmica

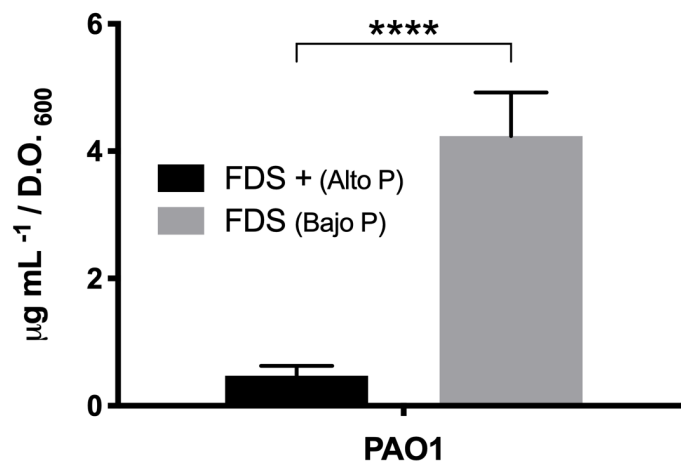
Figura 5.1: Curva de crecimiento de la cepa PAO1 en los medios FDS y FDS+. La línea negra representa el medio FDS+ (alto fosfato), mientras la línea gris representa el medio FDS (bajo fosfato). Los resultados mostrados son el promedio de tres réplicas biológicas, las barras de error representan la desviación estándar.

a) Producción de piocianina (comparativa visual)



(a) Comparativa visual de la producción de ramnolpidos en ambos medios de cultivo a las 16, 20 y 24 horas de crecimiento.

b) Producción de piocianina



(b) Cuantificación de la producción de piocianina a las 24 horas de crecimiento.

Figura 5.2: Producción de piocianina en FDS y FDS+. Los resultados mostrados son el promedio de tres réplicas biológicas, las barras de error representan la desviación estándar, los asteriscos indican significancia estadística por prueba T (****, $p < 0.0001$)

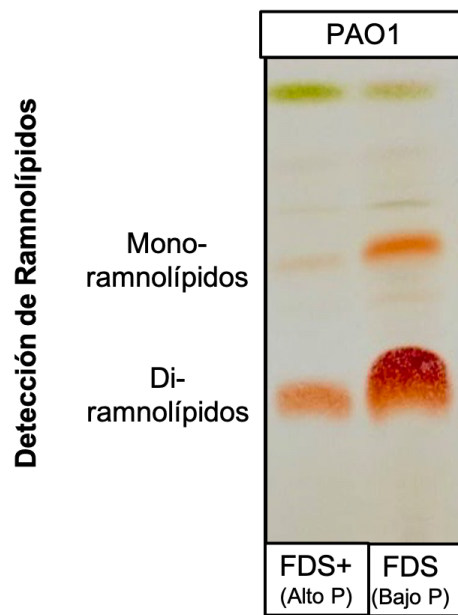


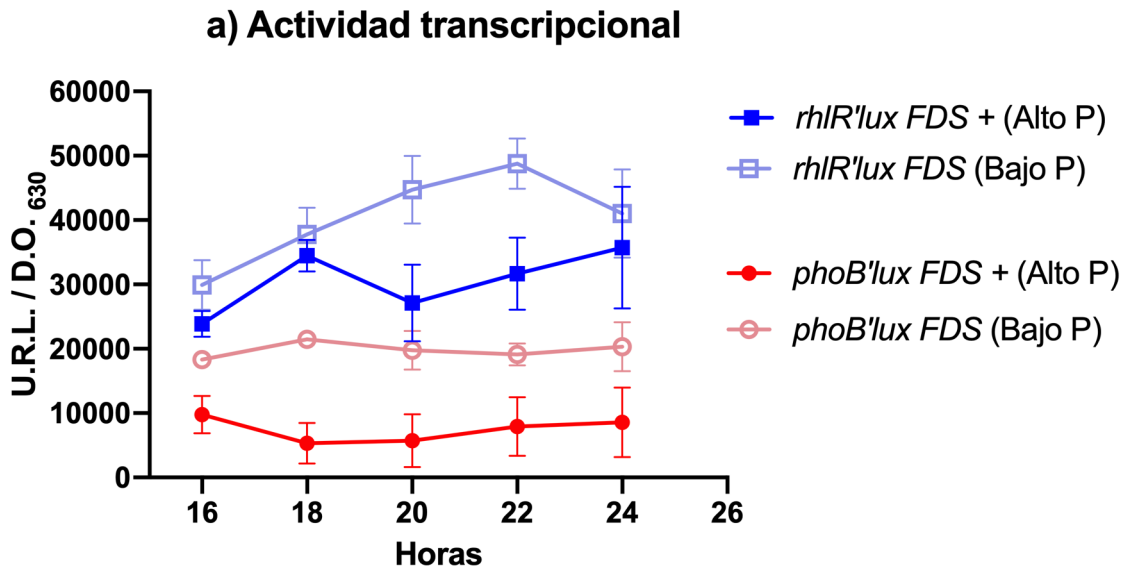
Figura 5.3: **Producción de ramnolípidos en FDS y FDS+.** Detección de ramnolípidos por cromatografía de capa fina, se observan los dos tipos de ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa*.

5.2. El sistema Rhl: RhlR se sobreexpresa en bajo fosfato

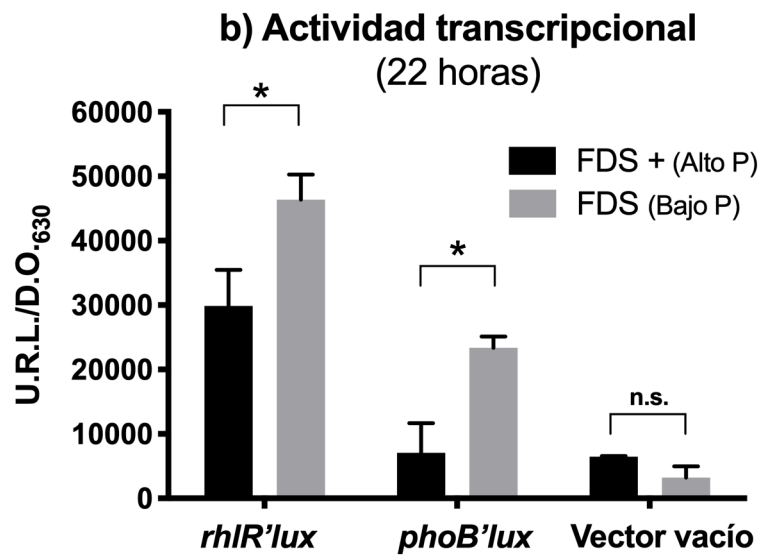
La producción de los fenotipos analizados anteriormente es regulada por QS, específicamente por el sistema Rhl (Fig. 1.1), por lo que estas observaciones podrían explicarse por una sobreexpresión del sistema Rhl en estas condiciones, como ya se ha sugerido anteriormente para la cepa SCV 20265 (Jensen *et al.*, 2006). Sin embargo, en dicha cepa la sobreexpresión de *rhlR* se observa en tiempos muy tardíos de la fase estacionaria (38.5 y 45 horas). Con el objetivo de evaluar si en la cepa PAO1 ocurre esta sobreexpresión, se evaluó la transcripción de *rhlR* utilizando una fusión transcripcional en 5 puntos durante la fase estacionaria (16-24 horas). Se observó que, efectivamente, la expresión de *rhlR* está aumentada en medio con bajo fosfato, analizamos la expresión de PhoB observándose un mayor incremento a las 22 horas (Fig.5.4a). Dado que el sistema PhoB-PhoR responde a bajas concentraciones de fosfato, analizamos la expresión de *phoB* en medio FDS y FDS+, como se esperaba, se observó una mayor expresión de *phoB* en bajo fosfato (Fig.5.4a), validando los medios de cultivo usados en este estudio. A partir de esta medición, se seleccionó el punto de las 22 horas para la medición de expresión genética (Fig.5.4b).

Se ha propuesto que *rhlR* es regulado por PhoB debido a la presencia de una caja *pho* putativa en su región regulatoria (Jensen *et al.*, 2006) (Fig. 5.5), lo cual explicaría esta sobreexpresión en bajo fosfato, condición en la que está activo el sistema PhoR-PhoB. Para probar si la inducción de *rhlR* en medio FDS es dependiente de PhoB, evaluamos su actividad transcripcional en una mutante *phoB*. Se observó que la actividad disminuye aproximadamente un 50% en ausencia de PhoB. La complementación de la mutante PhoB en *trans* restaura el nivel de expresión de *rhlR* observado en la cepa silvestre (Fig. 5.6a). Lo anterior sugiere que la expresión de *rhlR* es parcialmente dependiente de PhoB en la condición de bajo fosfato.

Con el objetivo de verificar si se trata de un regulación directa, se realizó un ensayo de movilidad electroforética (EMSA) utilizando PhoB purificada y el fragmento de la región reguladora de *rhlR* (Croda-García *et al.*, 2011; Jensen *et al.*, 2006) (Fig. 5.5). Como se observa en la (Fig. 5.6b), la presencia de PhoB ocasionó un retardo en el corrimiento del fragmento en el gel de acrilamida, sugiriendo una interacción directa. Como control positivo del ensayo se utilizó el promotor de *phoB* ya que también tiene una caja *pho* para su autorregulación



(a) Actividad transcripcional de las fusiones a las 16, 18, 20, 22 y 24 horas.



(b) Actividad transcripcional de las fusiones a las 22 horas.

Figura 5.4: Expresión de fusiones transcripcionales de *rhIR* y *phoB* en FDS y FDS+. Los resultados mostrados son el promedio de tres réplicas biológicas, las barras de error representan la desviación estándar. Los asteriscos indican significancia estadística por prueba T (*, $p < 0.05$).

(Anba *et al.*, 1990).

Los resultados anteriores sugieren que dentro de la región reguladora de *rhIR* se encuentra una caja *pho* funcional. Sin embargo, la caja *pho* propuesta por Jensen *et al* (2006) se encuentra sobrelapada con los dos inicios de la transcripción más proximales (Fig. 5.5), esta posición es poco común en reguladores positivos de la transcripción. Con el objetivo de determinar la presencia de otras posibles cajas *pho* en dicha región, se realizó una búsqueda basada en la secuencia consenso para cajas *pho* recién reportada por Wang *et al* (2021) utilizando el software *Prodoric* (Münch *et al.*, 2003). Como resultado se proponen tres nuevas cajas *pho* putativas mostradas en la Fig. 5.5.

a) Región regulatoria de *rhIR*

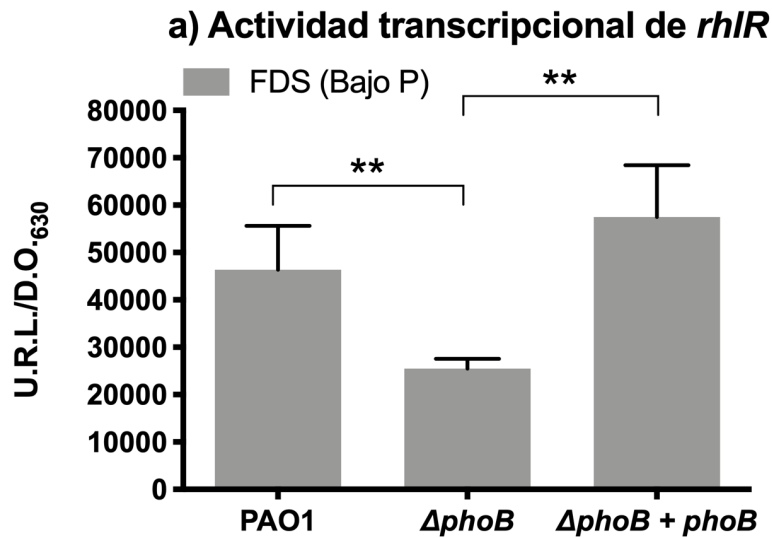
cajas *las-rhl*
 caja *pho* (Jensen, 2006)
 cajas *pho* propuestas
 inicios de transcripción

GAGCCTTGCTGCCATCGTGCGCCGGGCTGGTCCATCCGGGCGGTATCGGGGCCAT
 GAGCCTAGCCTTGGCGGCGGGGGTGCCGCAGGTGCTGCTGCCCTGTGCCACGAC
 CAGTTCGACAATGCCGAACGGCTGGTCCGGCTCGGCTGCGGGATGCGCCTGGGCG
 TGCCGTTGCGCGAGCAGGAGTTGCGCGGGGCGCTGTGGCGCTTGCTCGAGGACCC
 GGCCATGGCGGCGGCCTGTTCGGCGTTTCATGGAATTGTCACAACCGCACAGTATC
 GCTTGCGGTAAGCGGCCAGGTGGTTCGAACGTTGTCATAGGAGGGGGATGCTC
 GATGGCTGAAGGCTGCGTCCTGAACGGTGC TGGCATAACAGATAGGGTTGCCATG
 ATTTTGCCGTATCGGCAA GGCTGCGCGCTTGACAGCGTCATACCCCGGGCCAATT
 CTGCTGTGATGCATTTTATCGATCAGGGCTTACTGCAATG

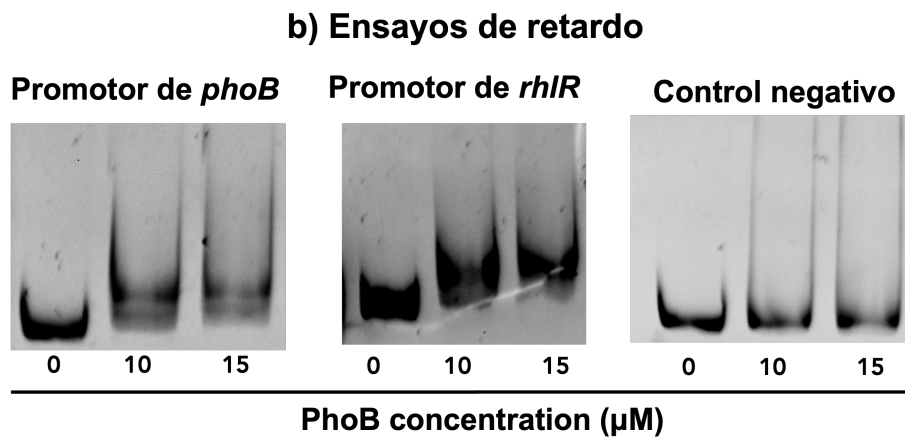
b) Comparación de cajas *pho* putativas en *rhIR*

phoB (Anba, 1990)	TGTCACATACCTGACAC
rhIR (Jensen, 2006)	GCTGTGATGCATTTTAT
rhIR-1	TGGTCCATCCGGGCGGT
rhIR-2	TGGCATAACAGATAGGG
rhIR-3	CGTCATACCCCGGGCCA
caja <i>pho</i> (Wang, 2021)	TGTCACAAAACITGTCAC CAAATGTTTCGAAAT

Figura 5.5: Región reguladora de *rhIR* y sus cajas *pho* putativas. a) Se resalta en naranja la caja *pho* putativa reportada por Jensen *et al* (2006), en rojo las tres cajas *pho* putativas propuestas en el presente trabajo, en verde-azul las cajas *las-rhl* y en letras rojas los nucleótidos correspondientes a los 4 inicios de la transcripción. b) Se comparan las cajas *pho* putativas encontradas en la región regulatoria de *rhIR* (una reportada por Jensen *et al* (2006) y tres propuestas en el presente trabajo) con la caja *pho* de *phoB* considerada caja de referencia y con el consenso de caja *pho* reportado recientemente por Wang *et al* (2021). Se muestran en negritas los nucleótidos conservados en las cajas putativas con respecto al consenso de Wang.



(a) Medición de la fusión transcripcional de *rhlR*.



(b) Ensayo de movilidad electroforética con la proteína PhoB.

Figura 5.6: **PhoB regula directamente a *rhlR***. a) Actividad transcripcional de *rhlR* en la cepa PAO1, su mutante en *phoB* y la mutante complementada con *phoB*, los asteriscos indican significancia estadística por prueba T (**, $p < 0.001$). Los resultados mostrados son el promedio de tres réplicas biológicas, las barras de error representan la desviación estándar. b) Ensayo de retardo o de movilidad electroforética (EMSA) de la proteína PhoB con la región reguladora de *phoB* (usada como control positivo), la región reguladora de *rhlR* y un fragmento interno del gen *pqsD* (usado como control negativo, ver material y métodos).

5.3. Relevancia de los sistemas de QS en la producción de factores de virulencia en bajo fosfato

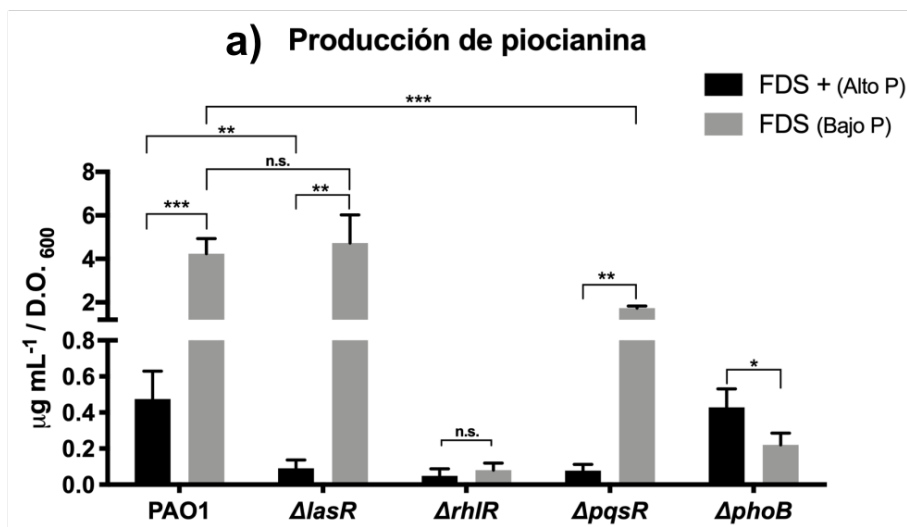
La sobreexpresión de *rhlR* en condiciones de bajo fosfato correlaciona con el fenotipo de sobreexpresión de piocianina y ramnolípidos anteriormente mostrados y señalan al sistema Rhl como importante en la activación de la expresión de estos factores en condiciones de bajo fosfato. Sin embargo, es necesario determinar la relevancia de los sistemas Las y Pqs en esta condición. Con dicho objetivo, se generaron mutantes en los genes que codifican para las proteínas reguladoras de cada sistema (*lasR*, *rhlR* y *pqsR*) y se analizó la producción de piocianina en cada cepa.

En el caso del medio FDS+ (alto fosfato), sólo se observa producción de piocianina en la cepa silvestre, mientras que en las tres mutantes de los sistemas de QS no se detecta producción (Fig. 5.7a). Estos resultados se ajustan a la jerarquía canónica del QS (Fig. 1.1), en la que el sistema Las se encuentra en la cima y es necesario para activar a los otros sistemas, y los sistemas Rhl y Pqs son requeridos para la expresión de piocianina. Siguiendo esta jerarquía, la inactivación de cualquiera de los tres sistemas afecta la producción de este factor de virulencia.

En el caso del medio FDS (bajo fosfato), sorprendentemente la mutante del sistema Las no se ve afectada en su capacidad para producir piocianina (Fig. 5.7a), esto sugiere una reestructuración de la regulación de los sistemas de QS que provoca que se vuelva independiente del sistema Las. Anteriormente se ha observado producción de piocianina en mutantes *lasR* pero esto se ha observado en tiempos tardíos (3 - 4 días) y en cultivo estático en la cepa PA14 (Cabeen, 2014). En el caso de la mutante en *rhlR*, ésta no fue capaz de producir piocianina en ninguno de los dos medios (Fig. 5.7a). Esto confirma la importancia del sistema Rhl como regulador directo de la producción de piocianina, contrastando con el sistema Las que sólo es indispensable en condiciones de alto fosfato siguiendo la jerarquía canónica. Mientras tanto, la mutante en *pqsR* en el medio FDS (bajo fosfato) muestra producción de piocianina reducida, lo cual confirma la relevancia de dicho sistema como modulador de la producción de piocianina pero su presencia no es indispensable en condiciones de bajo fosfato.

Adicionalmente se analizó la producción de ramnolípidos detectados por cromatografía de capa fina, lo observado fue muy similar a lo visto con piocianina (Fig. 5.7b); la mutante en el sistema Las, no es capaz de producir ramnolípidos en medio FDS+ (alto fosfato), mientras sí es capaz en medio FDS (bajo fosfato). Sugiriendo una vez más que el sistema Las pierde relevancia en condiciones de bajo fosfato.

Por otro lado, se analizó también la mutante en *phoB* en su producción de piocianina y ramnolípidos (Fig. 5.7), se observó que en medio FDS+ (alto fosfato) la producción de los factores de virulencia es similar a la cepa silvestre, sugiriendo que PhoB no tiene actividad en esta condición y su ausencia no causa ningún efecto. Mientras tanto, en medio FDS (bajo fosfato) la producción de ambos factores de virulencia se ve gravemente afectada por la ausencia de *phoB*. Lo anterior sugiere que la actividad del sistema PhoB-R en la regulación de factores de virulencia a través de QS sólo ocurre en condiciones de bajo fosfato.



b) Ramnolípidos

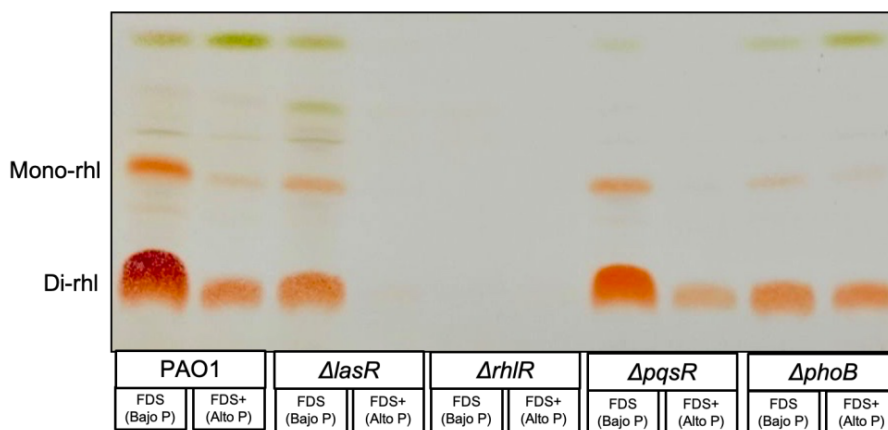


Figura 5.7: Producción de piocianina y ramnolípidos en FDS y FDS+ por cepa PAO1 y sus mutantes derivadas a) Cuantificación de la producción de piocianina. Los resultados mostrados son el promedio de tres réplicas biológicas, las barras de error representan la desviación estándar, los asteriscos indican significancia estadística por prueba T (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, n.s.= no significativo). b) Detección de ramnolípidos por cromatografía de capa fina, se observan los dos tipos de ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa*; Mono-rhl: monoramnolípidos, Di-rhl: diramnolípidos.

5.4. El sistema Las: LasR es dispensable en condiciones de bajo fosfato

El análisis de factores de virulencia en la mutante *lasR* sugiere que la relevancia de esta proteína reguladora es versátil y pasa de ser estrictamente necesaria para la producción de piocianina y ramnolípidos, a ser completamente dispensable para estos fenotipos en condiciones de bajo fosfato. Con el objetivo de estudiar más a fondo la regulación del sistema Las, se analizó la expresión de una fusión transcripcional de *lasR* en medio FDS y FDS+ utilizando una fusión transcripcional. Se ha reportado la presencia de una caja *pho* putativa en su región reguladora (Jensen *et al.*, 2006) (Fig. 5.8a), por lo que es posible que este gen sea regulado por PhoB en función de la disponibilidad de fosfato. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la actividad transcripcional de *lasR* permanece en los mismos niveles en ambos medios (Fig. 5.8b), lo que sugiere que *lasR* no es sujeto de regulación diferencial en función de la disponibilidad de fosfato. El análisis de la posible caja *pho* de LasR, muestra un menor grado de conservación con respecto a la caja *pho* de PhoB (Fig. 5.8, este hecho en conjunto con la falta de expresión diferencial por disponibilidad de fosfato sugieren que no se trata de una caja *pho* funcional).

Los resultados anteriores señalan que el sistema Las pierde relevancia en la regulación de factores de virulencia en condiciones de bajo fosfato. Sin embargo, es necesario evaluar la función regulatoria global de LasR en esta condición. Con dicho objetivo, se realizó un transcriptoma de la cepa PAO1 y su mutante en *lasR* en medio FDS y en FDS+.

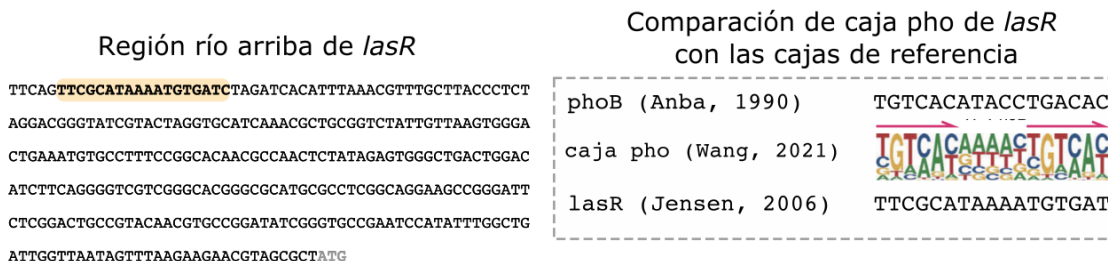
Medio alto en fosfato: La comparación de los transcriptomas de ambas cepas en medio FDS+ (alto fosfato) mostró 107 genes que son regulados positivamente por LasR (Fig. 5.9a); en este escenario, se confirma la relevancia de LasR como un regulador positivo tanto de los sistemas de QS (*lasI*, *rhlR*, *rhlI*, *pqsH*) y otros moduladores de QS (*rsaL*, *qscR*, *vqsR*), como de genes relacionados con la producción de factores de virulencia (*lasA*, *lasB*, operones *phzA-G* y *rhlAB*, *rhlC*) (Lista completa de genes y sus funciones en Anexo 1). Además se observó que LasR regula negativamente a 12 genes (Anexo 2), los cuales están implicados en dos complejos; (I) La bomba de eflujo formada por MexAB-OprM, que se ha relacionado con el

transporte de 3-O-C12-HSL, lo cual podría indicar que el sistema Las promueve la inactivación de esta bomba para mantener dicho autoinductor adentro de la célula y mantener el sistema activo, y (II) genes incluidos en la isla del sistema de secreción tipo VI (*clpV1*, *VgrG1*, *tagQ1*, *tssL1*), anteriormente se había reportado la regulación negativa de LasR contra otro gen de dicha isla (Lesic *et al.*, 2009). LasR ha sido considerado como un regulador positivo global lo cual se confirma en este medio. Sin embargo, su función como regulador negativo, al ser menor, ha sido poco explorada. En la sección de *discusión* se aborda más sobre este tema.

Medio bajo en fosfato: Sorprendentemente, en medio FDS (bajo fosfato) la comparación entre PAO1 y su mutante en *lasR* no mostró genes diferencialmente expresados (Fig. 5.9b) (a excepción de *lasR*, al ser una comparativa entre la cepa silvestre y la mutante en dicho gen). Esta conclusión es soportada por los tres paquetes estadísticos utilizados para analizar la expresión diferencial (DESeq, edgeR y limma-vomm). Estos resultados apoyan la premisa de que en medio con bajo fosfato el sistema Las, en específico la proteína LasR, se vuelve dispensable y esto no sólo es a nivel de la regulación de los factores de virulencia que se evaluaron, sino que se trata de un fenómeno global. Esta aportación es de gran importancia debido a que el sistema Las es blanco de muchos de los esfuerzos que buscan inactivar la respuesta de QS para contrarrestar las infecciones, por lo que es necesario hacer notar que existen condiciones en las que bloquear al sistema Las no tendría efecto alguno.

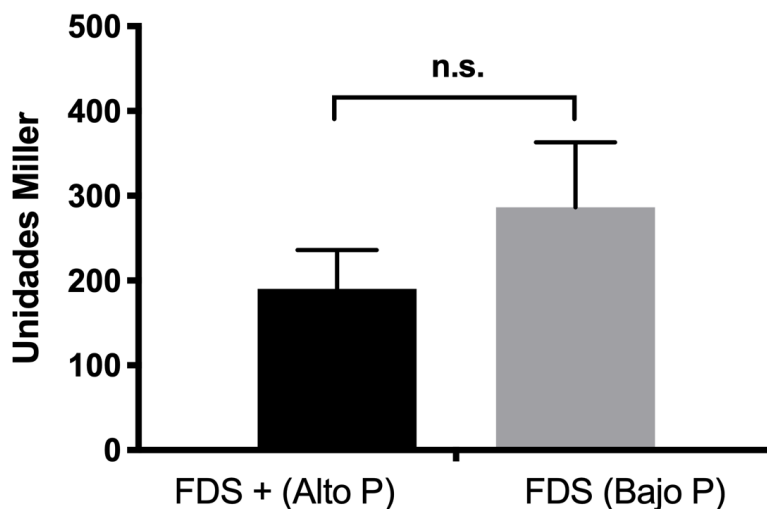
Con el objetivo de corroborar la dispensabilidad de *lasR* en un fenotipo directamente dependiente del sistema Las, se analizó la producción de elastasa LasB en la cepa PAO1 y sus mutantes en *lasR* y *rhlR* en medio FDS y FDS+. Como se observa en la Fig. 5.10a, en el medio FDS+, la producción de elastasa se ve afectada con la inactivación de cualquiera de los dos sistemas de QS, como se había reportado previamente para medios ricos (Soto-Aceves *et al.*, 2019). Sin embargo, en medio FDS (bajo fosfato) la inactivación del sistema Las no afecta la producción de elastasa (Fig. 5.10b), pasando a ser un fenotipo dependiente sólo del sistema Rhl.

a) Caja *pho* en *lasR*



(a) Análisis de la caja *pho* putativa de *lasR*

b) Actividad transcripcional de *lasR*



(b) Actividad transcripcional de la fusión de *lasR*

Figura 5.8: La expresión de *lasR* no está regulada por la disponibilidad de fósforo. a) Izquierda: la caja *pho* putativa de *lasR* se muestra resaltada en color. Derecha: se muestra la comparación de la caja *pho* putativa de *lasR* con las secuencias de referencia. b) Actividad transcripcional de la fusión de *lasR*. Los resultados mostrados son el promedio de tres réplicas biológicas, las barras de error representan la desviación estándar, n.s.= no hay significancia estadística por prueba T.

PAO1 vs $\Delta lasR$

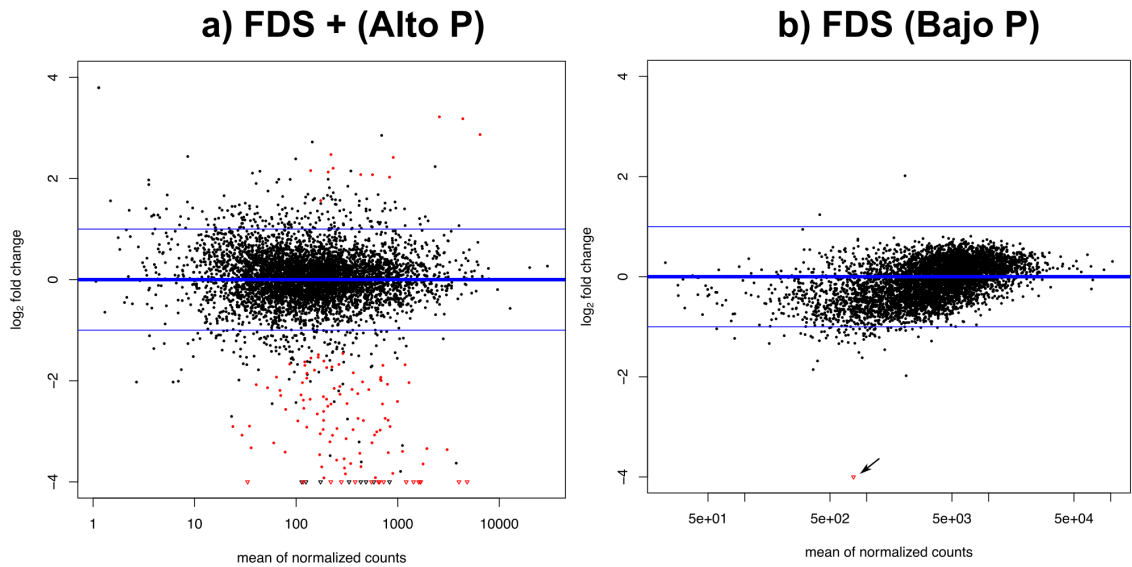


Figura 5.9: **La actividad regulatoria de LasR no es significativa en bajo fosfato.** Gráficos basados en los genes considerados como diferencialmente expresados por DESeq2, cada gen es representado como un punto. Los genes validados estadísticamente como diferencialmente expresados son marcados con rojo. El eje X muestra el promedio de cuentas normalizadas y el eje Y muestra el log₂ del *Fold Change* (*veces que más se expresa*) entre ambas cepas. Las líneas azules denotan el límite establecido de log₂ del *Fold Change*, todos los genes que salen de las líneas rebasan el valor de 1 establecido como mínimo. **En otras palabras, todos los genes que rebasan las líneas azules tuvieron una expresión diferencial de más del doble comparando la cepa PAO1 contra la mutante en *lasR*, pero solo aquellos rojos tienen validez estadística.** a)Comparativa de expresión diferencial genética entre la cepa PAO1 y la mutante *lasR* crecidas en FDS+ (alto fosfato). b)Comparativa de expresión diferencial genética entre la cepa PAO1 y la mutante *lasR* crecidas en FDS (bajo fosfato), la flecha señala al punto que representa a *lasR*, el cual fue el único gen diferencialmente expresado en dicha comparativa.

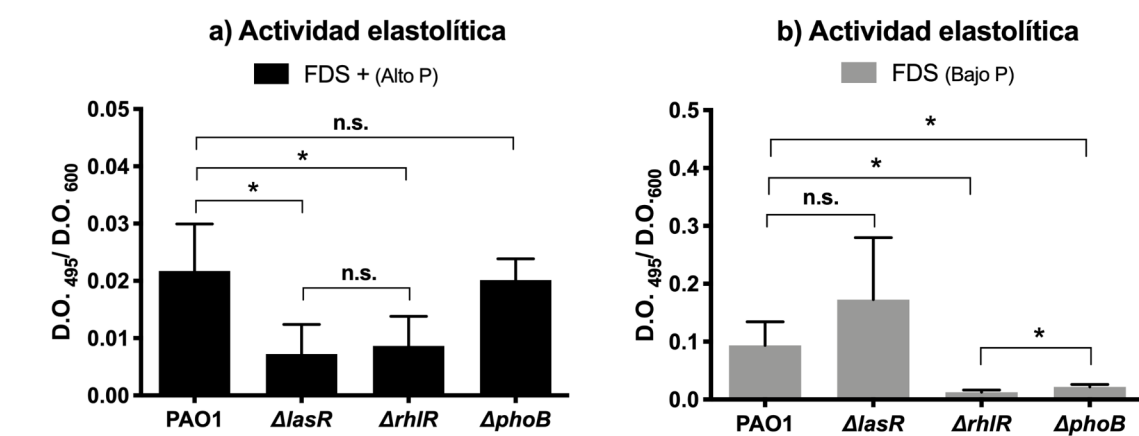


Figura 5.10: Medición de actividad elastolítica en la cepa PAO1 y sus mutantes en *lasR* y *rhlR*. a) Medición en medio FDS+ (alto fofato). b) Medición en medio FDS (bajo fofato). Los resultados mostrados son el promedio de tres réplicas biológicas, las barras de error representan la desviación estándar, los asteriscos indican significancia estadística por prueba-T (*, $P < 0.05$, n.s.= no significativo).

5.5. La producción de piocianina en el medio con bajo fosfato depende del operón *phzA1*

La producción de piocianina depende de la expresión de las enzimas codificadas en los operones *phzA1* y *phzA2*, ambos operones contribuyen a la producción de piocianina y son regulados por RhlR/C4-HSL (Jimenez *et al.*, 2012), aunque solo se ha reportado una caja *las-rhl* en el promotor de *phzA1* (Whiteley y Greenberg, 2001).

Con el objetivo de describir si ambos operones participan en la sobreproducción de piocianina independiente del sistema Las que se observa en bajo fosfato (Fig. 5.7), se analizó la expresión de fusiones transcripcionales de ambos operones en la mutante *lasR* en medio FDS (bajo fosfato) (Fig. 5.11). Se observó que en la mutante *lasR* el operón *phzA1* muestra altos niveles de transcripción, mientras el operón *phzA2* muestra solo una ligera actividad. Esto sugiere que la producción de piocianina independiente de Las depende principalmente del operón *phzA1*.

Actividad transcripcional de los operones *phz* medio FDS

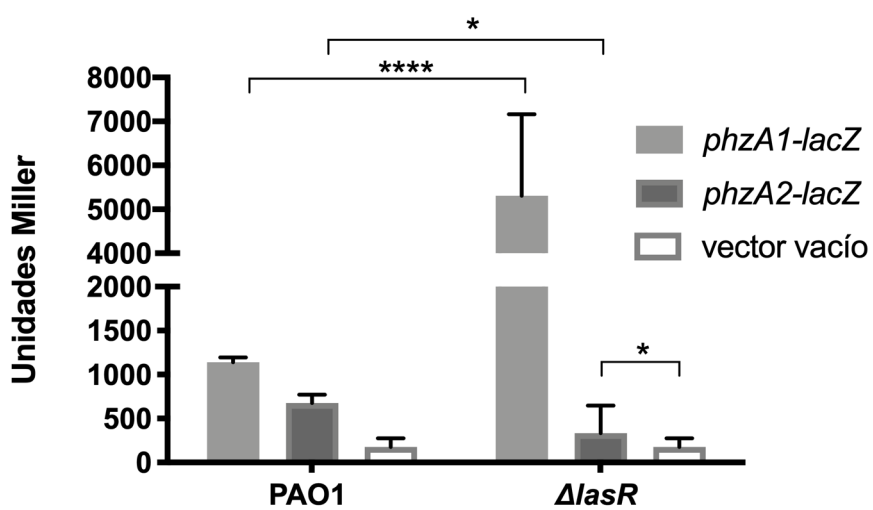


Figura 5.11: Actividad transcripcional de la región reguladora de los operones *phz* en medio FDS (bajo fosfato). Los resultados mostrados son el promedio de tres réplicas biológicas, las barras de error representan la desviación estándar, los asteriscos indican significancia estadística por prueba T (*, $P < 0.05$, ****, $P < 0.0001$)

5.6. PhoB y su relación con PqsE

Con el objetivo de analizar si la regulación que ejerce PhoB sobre *rhlR* es suficiente para explicar el fenotipo de sobreexpresión de piocianina, se utilizó a la mutante *phoB*, la cual en bajo fosfato produce muy poca piocianina (Fig 5.7) y se complementó con los elementos del sistema Rhl: *rhlR*, C4-HSL y con *pqsE*. Como se mencionó antes, la proteína PqsE codificada en el operón *pqsABCDE*, participa en la regulación de la producción de piocianina, con un mecanismo que aún no se ha descrito con exactitud.

Se observó que la mutante en *phoB* es capaz de sintetizar piocianina si se sobreexpresa *pqsE* en *trans* (Fig. 5.12). Esto podría sugerir que PhoB además de regular a *rhlR* podría regular a *pqsE* propiciando la sobreproducción de piocianina. Para corroborarlo se analizó la expresión de *pqsE* por RT-PCR, para lo que se extrajo RNA a las 16 y a las 22 horas de crecimiento de las cepas PAO1 y su mutante *phoB*.

Se observó que a las 22 horas en la mutante en *phoB* la cantidad de transcrito de *pqsE* es menor que en la cepa silvestre (Fig. 5.13). Esto sugiere que la transcripción de *pqsE* es menor en la mutante *phoB*. Estos resultados indicarían que existe regulación por parte de PhoB sobre *pqsE*. Sin embargo, aún es necesario determinar si la regulación de *pqsE* está determinada por el promotor de su operón (*pqsA*) o de un posible promotor interno, y validar esta expresión con qPCR, por lo que los resultados aún no son concluyentes. La contribución de PqsE a este fenotipo no es el objetivo principal de este trabajo y aún quedan elementos por determinar.

Producción de piocianina en la mutante *phoB* medio FDS

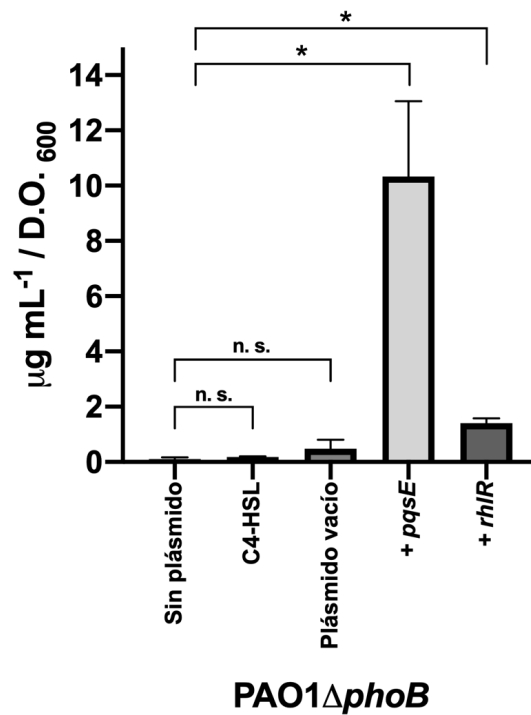


Figura 5.12: Producción de piocianina en la cepa mutante en *phoB* complementada con C4-HSL, *rhlR* y *pqsE* en medio FDS (bajo en fosfato). Los resultados mostrados son el promedio de tres réplicas biológicas, las barras de error representan la desviación estándar, los asteriscos indican significancia estadística por prueba T (*, $P < 0.05$, n.s.= no significativo)

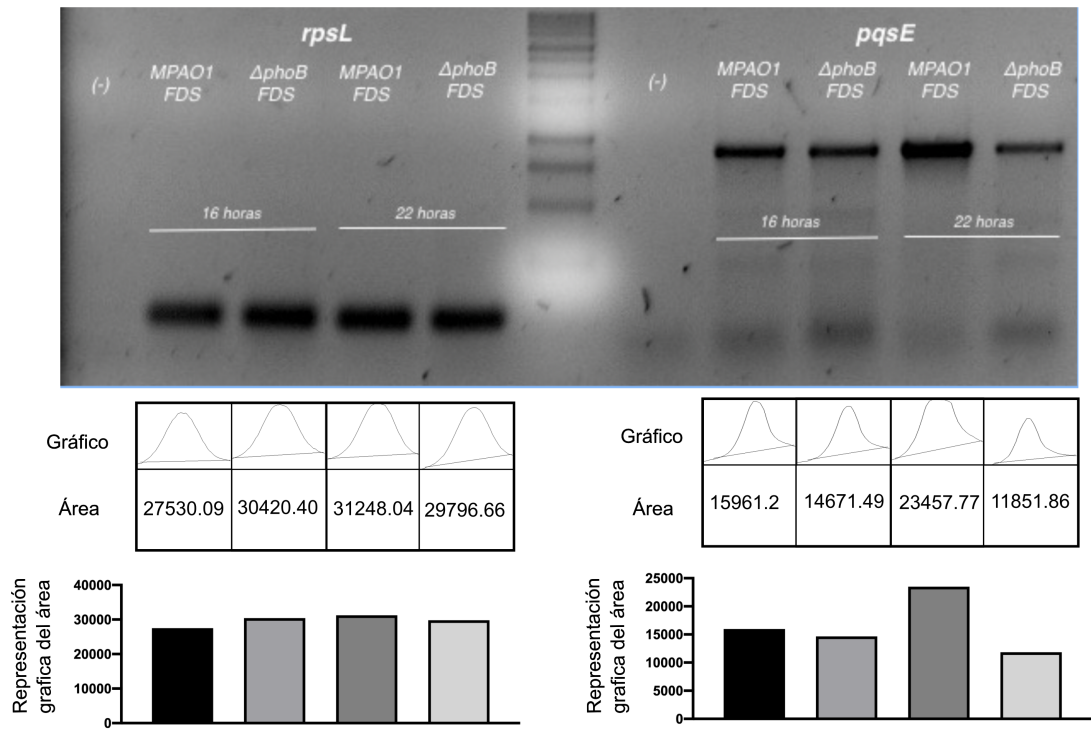


Figura 5.13: Gel de electroforesis correspondiente a la RT-PCR del gen *pqsE* en la cepa PAO1 y su mutante en *phoB* a las 16 y 22 horas de crecimiento en medio FDS (bajo fosfato). Como control se utilizó el gen *rpsL* cuya transcripción permanece constante. En la sección inferior se muestra el análisis cuantitativo de las bandas observadas incluyendo: gráfico, área bajo la curva y gráfico de barras. Análisis generado con ImageJ.

Capítulo 6

Discusión

6.1. La flexibilidad de los sistemas de QS

La necesidad urgente de buscar alternativas para contender con las infecciones de *P. aeruginosa*, ha puesto como prioridad la búsqueda de compuestos que puedan inhibir la respuesta de QS con el objetivo de evitar que *P. aeruginosa* active la producción de factores de virulencia. Estos enfoques denominados *Quorum quenching* se han centrado por mucho tiempo en bloquear al sistema Las principalmente, debido al papel jerárquico que ejerce en la regulación de QS. Sin embargo, la presencia común de aislados con un sistema Las afectado (principalmente mutantes en *lasR*), hizo cuestionar la relevancia de este sistema en el ambiente de infección.

Una de las explicaciones que surgieron fue el fenómeno de aprovechamiento de bienes comunes, el cual se basa en la hipótesis de que en la infección se generan poblaciones genotípicamente diversas, y algunas de ellas aunque no tengan la posibilidad de encender a los sistemas de QS y producir factores de virulencia, se benefician de los factores de virulencia producidos por las demás bacterias, que en este contexto serían los bienes comunes. Esta manera de beneficiarse de los bienes comunes incluso podría brindarles ventajas en crecimiento al no estar destinando energía para la producción de sus propios factores de virulencia. A este tipo de bacterias se les denomina *cheaters*. Sin embargo, el caso de las *cheaters* no es necesariamente el caso de las mutantes *lasR*, ya que son capaces de producir factores de

virulencia e inducir infección por ellas mismas. Esto abrió las puertas al estudio de cepas atípicas y de condiciones específicas en las que la regulación de los sistemas de QS podría no ajustarse al modelo canónico descrito a través de los años. Algunas de las condiciones anteriormente reportadas en las que mutantes *lasR* son capaces de producir factores de virulencia han sido tiempos de crecimiento largos (desde 24 horas hasta 3-4 días) en el caso de la cepa PA14 (Cabeen, 2014; Dekimpe y Deziel, 2009) o en diferentes aislados tanto ambientales como clínicos (Grosso-Becerra *et al.*, 2014). En este contexto, se ha argumentado que el papel del sistema Las es dependiente del tiempo, y es por eso que puede llegar a ser dispensable en cultivos con largos tiempos (fase estacionaria-fase estacionaria tardía) (Cabeen, 2014), mientras en tiempos tempranos aún se ve su relevancia (fase logarítmica tardía-fase estacionaria temprana) (Soto-Aceves *et al.*, 2019).

En el presente trabajo se exploró la regulación de los sistemas de QS en una de las cepas tipo en las que se describió esta jerarquía canónica, la cepa PAO1. Sin embargo, en este caso se analizó dicha regulación en un medio con fosfato suficiente (FDS+) y un medio con limitación de fosfato (FDS) y se observó que dependiendo de la disponibilidad de fosfato se puede pasar de un modelo jerárquico que depende estrictamente de la proteína LasR a un modelo en el que LasR pierde su función global. Además muestra como la jerarquía puede llegar a ser flexible independientemente del tiempo de crecimiento, ya que en el medio con fosfato suficiente (FDS+) la jerarquía es mantenida durante la fase estacionaria, mismo punto en el que en medio FDS (bajo fosfato) la jerarquía dependiente de LasR es inoperante. Estos resultados nos permiten proponer dos modelos regulatorios (Fig. 6.1) y muestra como existen distintas formas en que la jerarquía de QS se adapta y puede llevar a la dispensabilidad del sistema Las, lo cual explicaría por qué es común aislar mutantes en *lasR*.

Con respecto al sistema Rhl, se perfila como el sistema más importante para la producción de factores de virulencia, ya que mantiene su relevancia en ambas condiciones e incluso su sobreexpresión realza su importancia en condiciones de bajo fosfato, gracias a la regulación directa ejercida por PhoB. Mientras tanto el sistema Pqs, mantiene su papel de modulador de la respuesta de QS en condiciones de bajo fosfato, ya que en ambas condiciones contribuye especialmente a la regulación de la síntesis de piocianina. Además se observó que *pqsE* podría tener una regulación PhoB dependiente. El año pasado se publicó un estudio en el

que se reporta que *pqsR* y *pqsA* se expresan más en condiciones de bajo fosfato de manera PhoB dependiente (Meng *et al.*, 2020). Lo anterior complementa los resultados del presente proyecto con respecto a la situación del sistema Pqs en esta condición de bajo fosfato.

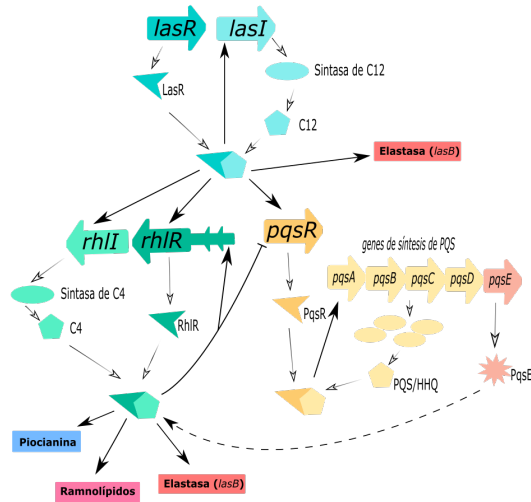
6.2. La producción de factores de virulencia en bajo fosfato

En el presente trabajo se analizaron tres de los principales factores de virulencia de *P. aeruginosa*; piocianina, elastasa y ramnolípidos. En el caso de la elastasa LasB, codificada por uno de los principales genes dependientes del sistema Las, se observó como su producción pasa de ser dependiente de los sistemas Las y Rhl en condiciones de fosfato suficiente, y se vuelve completamente dependiente del sistema Rhl e independiente del sistema Las en medio con bajo fosfato (Meng *et al.*, 2020). Resulta interesante como uno de los principales genes blanco del sistema Las logra sobrepasar esa dependencia en condiciones de bajo fosfato. En este contexto, se ha reportado que *lasI*, otro de los principales genes blanco de LasR y que codifica para la sintasa de 3-O-C12-HSL, puede ser regulado por PhoB. Sin embargo, a pesar de esta regulación, los niveles de 3-O-C12-HSL permanecen sin cambios significativos en alto y bajo fosfato. Como se reporta en este trabajo, la actividad del sistema Las es dispensable en condiciones de bajo fosfato y el significado biológico, si lo hubiera, de la regulación que ejerce PhoB sobre *lasI* aún tendrá que ser determinado.

Los ramnolípidos fueron analizados de manera semi-cuantitativa, se observó que en bajo fosfato existe mayor producción de dichos surfactantes y que esta producción depende del sistema Rhl únicamente, ya que su producción fue posible en ausencia de *lasR* y de *pqsR*.

La piocianina fue el fenotipo analizado a mayor detalle, se observó que en bajo fosfato se sobreexpresa y que esta producción se vuelve Las-independiente. Además la producción de piocianina se ve afectada en un 50% por la ausencia de *pqsR*. Si bien se ha mencionado que el sistema Pqs modula positivamente los fenotipos dependientes de Rhl, en este medio se observa claramente que la modulación es más importante para el fenotipo de piocianina y no muy perceptible para el fenotipo de ramnolípidos, en el que la ausencia de *pqsR* no muestra un efecto notorio. Esta posibilidad del sistema Pqs de regular de manera más marcada a un

FDS+ ALTO P



FDS BAJO P

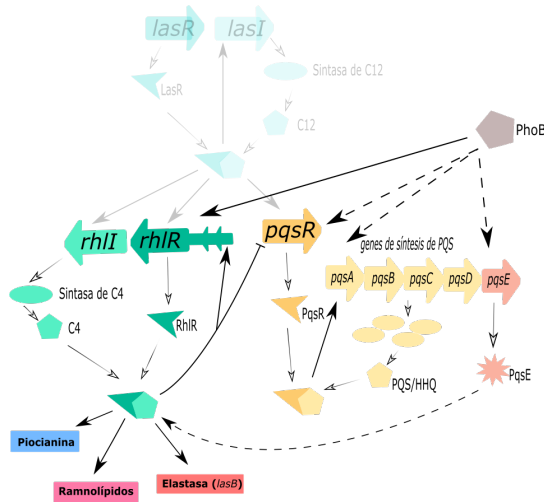


Figura 6.1: Los sistemas de *quorum sensing* de *Pseudomonas aeruginosa* y su regulación en alto y bajo fosfato. Los genes son representados como flechas de colores indicando su dirección en el genoma, las proteínas y moléculas señal son representadas con figuras de colores, las flechas con punta negra indican regulación positiva, mientras que las líneas con punta perpendicular indican regulación negativa, líneas continuas indican regulación directa, mientras las líneas punteadas indican que el mecanismo de regulación no ha sido determinado con exactitud. C12: 3-O-C12-HSL, C4: C4-HSL.

fenotipo que a otro, aún cuando ambos son fenotipos Rhl dependientes, se sigue investigando y podría revelar aspectos importantes de su mecanismo molecular. Además de los sistemas Rhl y Pqs, existen otros elementos que podrían aportar a este fenotipo de sobreexpresión de piocianina. Recientemente se reportó que PhoB puede regular al operón *phzA1* (Huang *et al.*, 2019), lo que se podría tratar de una regulación positiva que contribuiría a la sobreexpresión de este operón que se observó en este trabajo (Fig. 5.11). La producción de piocianina requiere varios pasos para su síntesis, es por eso que seguramente existen otros mecanismos que contribuyen a su sobreexpresión en bajo fosfato.

La producción de piocianina es un importante factor de virulencia en el contexto médico debido a su alta capacidad de generar estrés oxidativo. Sin embargo, en el contexto biológico, se ha reportado que una posible explicación para esta sobreproducción de fenazinas puede estar relacionada con la obtención de fósforo de otras fuentes gracias a su acción redox (McRose y Newman, 2021), esto brinda una posible explicación para la elevada producción de piocianina observada en estas condiciones.

6.3. LasR como regulador negativo de la respuesta de QS

Si bien LasR no presentó una función evidente en el medio bajo en fosfato (FDS) en la fase estacionaria, no se puede descartar la posibilidad de que tenga un papel regulatorio en otra etapa del crecimiento, lo cual podría ser objeto de estudio en investigaciones próximas. Sin embargo, por ahora sí podemos analizar más a detalle su papel regulatorio global en el medio FDS+ (alto fosfato) en donde sí se obtuvieron genes diferencialmente expresados.

LasR es considerado como un importante regulador positivo en *P. aeruginosa*, lo cual ha sido ampliamente estudiado y se comprobó con los resultados del transcriptoma, sin embargo, es importante recalcar que su papel como regulador negativo no se ha explorado a fondo.

Basándonos directamente en los resultados obtenidos, los genes regulados negativamente que cuentan con un mejor respaldo estadístico (por sus valores de p-ajustada) son los genes de la bomba MexAB-OprM (Anexo 2). Como se mencionó anteriormente, esta bomba se ha relacionado con el transporte de 3-O-C12-HSL, lo cual podría indicar que el sistema Las

promueve la inactivación de esta bomba para mantener dicho autoinductor adentro de la célula y mantener el sistema activo. Estos genes forman parte de un operón, en donde el primer gen es *mexA*. Hasta el momento solo hay un reporte de un estudio masivo en donde se reporta que LasR regula a *mexA* (Huang *et al.*, 2019). Con estos antecedentes, se buscó la presencia de cajas *las-rhl* en el promotor de *mexA* y se encontró una posible caja (Fig. 6.2) (Anexo 3), lo que sugiere que se podría tratar de una regulación directa.

Además de estos genes regulados negativamente, se detectaron algunos genes que son regulados positivamente por LasR, pero que su función está relacionada con actividades que provocarían una regulación negativa hacia la respuesta de QS, especialmente hacia el sistema Pqs. Tal es el caso de los genes de los operones *antABC* y *xylXYZL* y sus respectivos reguladores *antR* y *xylS*, estos genes se encuentran en el mismo *cluster* y participan en la degradación de antranilato a catecol (Fig. 6.3) (Kanehisa y Goto, 2000). El antranilato es un precursor de la síntesis de las moléculas señal del sistema Pqs (PQS y HHQ), por lo que el hecho de que LasR lo regule positivamente estaría provocando una regulación negativa hacia el sistema Pqs al limitar la síntesis de sus moléculas señal. Se buscó la presencia de cajas *las-rhl* en estos genes y se encontraron cajas putativas en las regiones río arriba de *antA*, *antR* y *xylX* (Fig. 6.2, 6.3) (Anexo 3), lo que sugiere que se podría tratar de una regulación directa.

Otro caso similar es el de la bomba MexGHI-OmpD que también se ve regulada positivamente por LasR, la actividad de dicha bomba se ha considerado como favorable para los sistemas de QS. Sin embargo, esta bomba se encarga de exportar antranilato o sus derivados (Aendekerk *et al.*, 2005), lo cual en exceso podría limitar la síntesis de las moléculas señal del sistema Pqs.

En resumen, el sistema Las presenta regulación positiva de elementos que participan en la degradación y exportación de antranilato, la importancia biológica de esta regulación podría contribuir a mantener el equilibrio entre los sistemas y a exportar intermediarios que pueden ser tóxicos en exceso. Este breve análisis busca resaltar el papel de LasR como un regulador negativo de la respuesta de QS en condiciones de fosfato suficiente donde su función es muy relevante. Por lo anterior, es importante considerar a LasR tanto como regulador positivo

como negativo de la respuesta de QS, lo cual nos permitirá entender de mejor manera los fenotipos que se obtienen en cepas en donde se sobreexpresa o se elimine esta proteína.

Comparación de las secuencias identificadas:

<i>rsaI</i>	A ACT AGCAAATGAGAT AG AT
<i>lasI</i>	AT CT ATCTCATT TGCTAG TT
<i>rhlR-1</i>	CC CT GTGCCCACGACC AG TT
<i>rhlR-2</i>	TG CT GGCATAACAGAT AG GG
<i>rhlR-3</i>	GG CT GGCGCTTGAC- AG CG
<i>mexA(1)</i>	TT CT TCGAGCCGGTGC AG CG
<i>antA(1)</i>	TG CT GGAACTGCACC- AG TC
<i>antR(1)</i>	TT CT TTTCGAAGATC- AG CT
<i>antR(2)</i>	AT CT CCAGGTCGAAC- AG CT
<i>xylX(1)</i>	TG CT GACCCTGCTGA- AG AC
<i>xylX(2)</i>	CG CT GTTCGAGCGCC- AG CT
<i>mexG(1)</i>	AA CT CGCCCCGGCAG AG GT
<i>mexG(2)</i>	AC CT CAACTTAACTTG AG GT

Figura 6.2: Cajas *las-rhl* putativas comparadas con cajas *las-rhl* de referencia. Se muestran las cajas putativas encontradas en la región río arriba de los genes *mexA*, *antA*, *antR*, *xylX* y *mexG* comparadas con cajas previamente descritas de *rsaI*, *lasI* y *rhlR*. En color se resaltan los nucleótidos considerados invariables para cajas *las-rhl*.

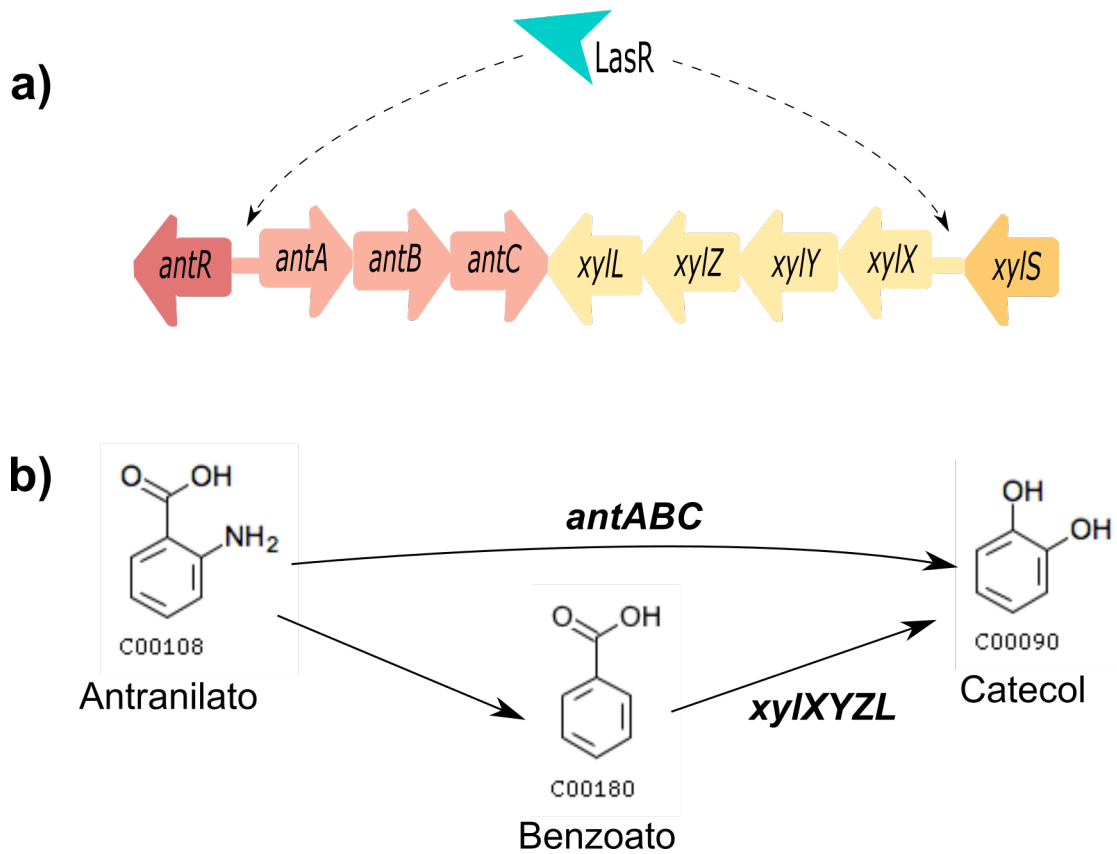


Figura 6.3: Regulación de LasR sobre la degradación de antranilato. a) Se muestra la localización de los genes de los operones *antABC* y *xylXYZL* y sus respectivos reguladores *antR* y *xylS*. Se muestran líneas punteadas a las regiones reguladoras en las que se encontraron cajas *las-rhl* putativas. b) Participación de las enzimas codificadas por los operones *antABC* y *xylXYZL* en la degradación de antranilato. Basado en la base de datos *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*.

Capítulo 7

Conclusiones

1.- La jerarquía de interregulación de los sistemas de QS en la que el sistema Las se encuentra en la cima, no es válida para condiciones de bajo fosfato, donde el sistema Las es dispensable y prácticamente carece de función.

2.-El sistema Rhl es indispensable para la producción de piocianina, ramnolípidos y elastasa tanto en condiciones de alto fosfato como en condiciones de bajo fosfato. En esta última condición, PhoB se encarga de promover la sobreexpresión de *rhlR* lo que puede explicar la sobreexpresión de dichos fenotipos en esa condición.

3.- El sistema Pqs mantiene su papel de modulador de la respuesta de QS en condiciones de bajo fosfato. Su contribución a la regulación de la síntesis de piocianina es importante pero no indispensable en condiciones de bajo fosfato.

4.- Los resultados presentados en el presente trabajo demuestran que el sistema Las puede llegar a ser dispensable y apuntan al sistema Rhl como el más importante, esto es de gran relevancia para poder enfocar los esfuerzos de investigación que buscan bloquear el QS para contender contra las infecciones de *P. aeruginosa*.

Capítulo 8

Perspectivas

1.- El presente proyecto deja abierta la posibilidad de esclarecer la regulación de PhoB sobre *pqsE* y determinar si esta ocurre desde el promotor de *pqsA* o bien desde un posible promotor de *pqsE*.

2.- Con el objetivo de determinar otros elementos que podrían contribuir a la sobreexpresión de piocianina en bajo fosfato, se podría analizar a detalle la expresión de otros genes que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de piocianina ya que se trata de una vía que involucra varios pasos. Así como analizar la participación de RNAs pequeños que podrían participar en dicha modulación.

3.- Debido a la relevancia del sistema PhoB-R en la regulación de los sistemas de QS, se podría analizar si al inactivar dicho sistema se disminuye la virulencia de *P. aeruginosa* en modelos animales o cultivos celulares.

4.- Retomando las hipótesis exploradas en la discusión sobre LasR como un regulador negativo, se podría sobreexpresar LasR para maximizar su efecto regulatorio y analizar si se ve afectada negativamente la expresión de los sistemas de QS y factores de virulencia.

Referencias

- Aendekerk, S., Diggle, S. P., Song, Z., Høiby, N., Cornelis, P., Williams, P., y Camara, M. (2005). The mexghi-opmd multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology*, *151*(4), 1113–1125.
- Anba, J., Bidaud, M., Vasil, M., y Lazdunski, A. (1990). Nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *phoB* gene, the regulatory gene for the phosphate regulon. *Journal of bacteriology*, *172*(8), 4685.
- Bains, M., Fernández, L., y Hancock, R. E. (2012). Phosphate starvation promotes swarming motility and cytotoxicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and environmental microbiology*, AEM-01015.
- Bansal, V. K. (1990). Serum inorganic phosphorus. *Clinical methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition.
- Beatson, S. A., Whitchurch, C. B., Sargent, J. L., Levesque, R. C., y Mattick, J. S. (2002). Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, *184*(13), 3605–3613.
- Becher, A., y Schweizer, H. P. (2000). Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. *Biotechniques*, *29*(5), 948–952.
- Bielecki, P., Jensen, V., Schulze, W., Gödeke, J., Strehmel, J., Eckweiler, D., ... Gerlach, R. G. (2015). Cross talk between the response regulators PhoB and TctD allows for the integration of diverse environmental signals in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic acids research*, *43*(13), 6413–6425.
- Blus-Kadosh, I., Zilka, A., Yerushalmi, G., y Banin, E. (2013). The effect of *pstS* and *phoB* on quorum sensing and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS one*, *8*(9), e74444.
- Bottomley, M. J., Muraglia, E., Bazzo, R., y Carfi, A. (2007). Molecular insights into quorum sensing in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* from the structure of the virulence regulator LasR bound to its autoinducer. *Journal of Biological Chemistry*,

282(18), 13592–13600.

- Brint, J. M., y Ohman, D. E. (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *Journal of Bacteriology*, 177(24), 7155–7163.
- Britigan, B. E., Rasmussen, G. T., y Cox, C. D. (1997). Augmentation of oxidant injury to human pulmonary epithelial cells by the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Infection and immunity*, 65(3), 1071.
- Brouwer, S., Pustelny, C., Ritter, C., Klinkert, B., Narberhaus, F., y 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. *Journal of bacteriology*, 196(23), 4163.
- Cabeen, M. T. (2014). Stationary phase-specific virulence factor overproduction by a *lasR* mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 9(2), e88743.
- Caiazza, N. C., Shanks, R. M., y O’toole, G. (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 187(21), 7351.
- Cao, H., Krishnan, G., Goumnerov, B., Tsongalis, J., Tompkins, R., y Rahme, L. G. (2001). A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25), 14613–14618.
- Choi, K.-H., y Schweizer, H. P. (2005). An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMC microbiology*, 5(1), 30.
- Chung, C., Niemela, S. L., y Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(7), 2172–2175.
- Croda-García, G., Grosso-Becerra, V., Gonzalez-Valdez, A., Servín-González, L., y Soberon-Chavez, G. (2011). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa rhlR*: role of the *crp* orthologue Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators *lasR* and *rhlR*. *Microbiology*, 157(9), 2545–2555.
- Davey, M. E., Caiazza, N. C., y O’Toole, G. A. (2003). Rhamnolipid surfactant production

- affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* pao1. *Journal of bacteriology*, 185(3), 1027.
- de Kievit, T. R., Kakai, Y., Register, J. K., Pesci, E. C., y Iglewski, B. H. (2002). Role of the *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in *rhlI* regulation. *FEMS microbiology letters*, 212(1), 101–106.
- Dekimpe, V., y Deziel, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology*, 155(3), 712–723.
- Denning, G. M., Railsback, M. A., Rasmussen, G. T., Cox, C. D., y Britigan, B. E. (1998). *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 274(6), L893–L900.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Cámara, M., y 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. *Molecular microbiology*, 50(1), 29–43.
- Engbrecht, J., y Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(13), 4154–4158.
- Essar, D., Eberly, L., Hadero, A., y Crawford, I. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of bacteriology*, 172(2), 884–900.
- Fagon, J.-Y., Chastre, J., Vuagnat, A., Trouillet, J.-L., Novara, A., y Gibert, C. (1996). Nosocomial pneumonia and mortality among patients in intensive care units. *Jama*, 275(11), 866–869.
- Farrow, J. M., Sund, Z. M., Ellison, M. L., Wade, D. S., Coleman, J. P., y Pesci, E. C. (2008). PqsE functions independently of PqsR-Pseudomonas quinolone signal and enhances the *rhl* quorum-sensing system. *Journal of bacteriology*, 190(21), 7043–7051.

- Filloux, A., y Ramos, J.-L. (2014). *Pseudomonas methods and protocols*. Humana Press New York.
- Frank, L., y DeMoss, R. (1959). On the biosynthesis of pyocyanine. *Journal of bacteriology*, *77*(6), 776.
- Galdino, A. C. M., de Oliveira, M. P., Ramalho, T. C., de Castro, A. A., Branquinha, M. H., y Santos, A. L. (2019). Anti-virulence strategy against the multidrug-resistant bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* : Pseudolysin (elastase B) as a potential druggable target. *Current Protein and Peptide Science*, *20*(5), 471–487.
- Gallagher, L. A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S., Pesci, E. C., y Manoil, C. (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, *184*(23), 6472–6480.
- Gallarato, L. A., Sanchez, D. G., Olvera, L., Primo, E. D., Garrido, M. N., Beassoni, P. R., ... Lisa, A. T. (2014). Exopolyphosphatase of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for the production of virulence factors, and its expression is controlled by NtrC and PhoB acting at two interspaced promoters. *Microbiology*, *160*(2), 406–417.
- Gambello, M. J., y Iglewski, B. H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *Journal of bacteriology*, *173*(9), 3000–3009.
- Gambello, M. J., Kaye, S., y Iglewski, B. H. (1993). LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*Apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infection and immunity*, *61*(4), 1180–1184.
- García-Reyes, S., Soberón-Chávez, G., y Cocotl-Yanez, M. (2020). The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* : Pseudomonas quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *Journal of medical microbiology*, *69*(1), 25–34.
- Gellatly, S. L., y Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*, *67*(3), 159–173.
- Gilbert, K. B., Kim, T. H., Gupta, R., Greenberg, E. P., y Schuster, M. (2009). Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Molecular microbiology*, *73*(6), 1072–1085.
- González-Valdez, A., Servín-González, L., Juárez, K., Hernandez-Aligio, A., y Soberón-

- Chávez, G. (2014). The effect of specific rhla-las-box mutations on dna binding and gene activation by pseudomonas aeruginosa quorum-sensing transcriptional regulators rhIR and lasR. *FEMS microbiology letters*, 356(2), 217–225.
- Groleau, M.-C., de Oliveira Pereira, T., Dekimpe, V., y Déziel, E. (2020). PqsE is essential for RhIR-dependent quorum sensing regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Msystems*, 5(3).
- Grosso-Becerra, M.-V., Santos-Medellín, C., González-Valdez, A., Méndez, J.-L., Delgado, G., Morales-Espinosa, R., ... Soberón-Chávez, G. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC genomics*, 15(1), 318.
- Gust, B., Chandra, G., Jakimowicz, D., Yuqing, T., Bruton, C. J., y Chater, K. F. (2004). λ red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Advances in applied microbiology*, 54, 107–128.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557–580.
- Hanzelka, B. L., y Greenberg, E. P. (1995). Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. *Journal of bacteriology*, 177(3), 815–817.
- Higgins, S., Heeb, S., Rampioni, G., Fletcher, M. P., Williams, P., y Cámara, M. (2018). Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 252.
- Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J., y Schweizer, H. P. (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(1), 77–86.
- Holloway, B. (1955). Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 13(3), 572–581.
- Huang, H., Shao, X., Xie, Y., Wang, T., Zhang, Y., Wang, X., y Deng, X. (2019). An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature communications*, 10(1), 1–13.

- Iglewski, B. H. (1996). Medical microbiology. En S. Baron (Ed.), (4ta ed., cap. 27). University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Jensen, V., Löns, D., Zaoui, C., Bredenbruch, F., Meissner, A., Dieterich, G., ... Häussler, S. (2006). RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and-independent pathways. *Journal of bacteriology*, 188(24), 8601–8606.
- Jimenez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., y Quax, W. J. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 76(1), 46.
- Jiménez-Jacinto, V., Sanchez-Flores, A., y Vega-Alvarado, L. (2019). Integrative differential expression analysis for multiple experiments (IDEAMEX): a web server tool for integrated RNA-seq data analysis. *Frontiers in genetics*, 10, 279.
- Kanehisa, M., y Goto, S. (2000). Kegg: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), 27–30.
- Kiratisin, P., Tucker, K. D., y Passador, L. (2002). LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. *Journal of bacteriology*, 184(17), 4912–4919.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., y 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. *Molecular microbiology*, 21(6), 1137–1146.
- Lesic, á., Starkey, á., He, J., Hazan, R., y Rahme, L. (2009). Quorum sensing differentially regulates *Pseudomonas aeruginosa* type vi secretion locus i and homologous loci ii and iii, which are required for pathogenesis. *Microbiology*, 155(Pt 9), 2845.
- Long, J., Zaborina, O., Holbrook, C., Zaborin, A., y Alverdy, J. (2008). Depletion of intestinal phosphate after operative injury activates the virulence of *P. aeruginosa* causing lethal gut-derived sepsis. *Surgery*, 144(2), 189–197.
- Love, M. I., Huber, W., y Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 1–21.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., y Sambrook, J. (1982). *Molecular cloning: a laboratory manual*

- (Vol. 545). Cold Spring harbor laboratory Cold Spring Harbor, NY.
- Markou, P., y Apidianakis, Y. (2013). Pathogenesis of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cancer. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3.
- Matsuyama, T., Sogawa, M., y Yano, I. (1987). Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. *Applied and environmental microbiology*, 53(5), 1186.
- Maura, D., Hazan, R., Kitao, T., Ballok, A. E., y Rahme, L. G. (2016). Evidence for direct control of virulence and defense gene circuits by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing regulator, MvfR. *Scientific reports*, 6(1), 1–14.
- Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G., y Thomashow, L. S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 183(21), 6454.
- McGrath, S., Wade, D. S., y Pesci, E. C. (2004). Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS microbiology letters*, 230(1), 27–34.
- McRose, D. L., y Newman, D. K. (2021). Redox-active antibiotics enhance phosphorus bioavailability. *Science*, 371(6533), 1033–1037.
- Medina, G., Juárez, K., Díaz, R., y Soberón-Chávez, G. (2003). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology*, 149(11), 3073–3081.
- Medina, G., Juárez, K., Valderrama, B., y Soberón-Chávez, G. (2003). Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *Journal of bacteriology*, 185(20), 5976–5983.
- Meng, X., Ahator, S. D., y Zhang, L.-H. (2020). Molecular mechanisms of phosphate stress activation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems. *Mosphere*, 5(2), e00119–20.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics.
- Miller, M. B., y Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165–199.

- Mohammadi-Samani, S., Kourosfard, S., y Azarpira, N. (2016). Effects of phosphate supplementation on *Pseudomonas aeruginosa* invasive behavior in burn wound infections: A simple approach to a big problem. *Burns*, 42(2), 428–433.
- Morales, E., González-Valdez, A., Servín-González, L., y Soberón-Chávez, 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 Microbiology Letters*.
- Mukherjee, S., Moustafa, D. A., Stergioula, V., Smith, C. D., Goldberg, J. B., y Bassler, B. L. (2018). The PqsE and RhlR proteins are an autoinducer synthase–receptor pair that control virulence and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(40), E9411–E9418.
- Münch, R., Hiller, K., Barg, H., Heldt, D., Linz, S., Wingender, E., y Jahn, D. (2003). Prodoric: prokaryotic database of gene regulation. *Nucleic acids research*, 31(1), 266–269.
- Olsen, R. H., DeBusscher, G., y McCombie, W. R. (1982). Development of broad-host-range vectors and gene banks: self-cloning of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *Journal of bacteriology*, 150(1), 60–69.
- Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L., y Iglewski, B. H. (1993). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science*, 260(5111), 1127–1131.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., y Iglewski, B. H. (1997). Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 179(10), 3127–3132.
- Preston, M. J., Seed, P. C., Toder, D. S., Iglewski, B. H., Ohman, D. E., Gustin, J. K., ... Pier, G. B. (1997). Contribution of proteases and LasR to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infections. *Infection and immunity*, 65(8), 3086–3090.
- Read, R. C., Roberts, P., Munro, N., Rutman, A., Hastie, A., Shryock, T., ... Taylor, G. (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *Journal of Applied Physiology*, 72(6), 2271–2277.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., y Smyth, G. K. (2015). lim-

- ma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic acids research*, 43(7), e47–e47.
- Robinson, M., McCarthy, D., Chen, Y., y Smyth, G. K. (2011). edgeR: differential expression analysis of digital gene expression data user’s guide. *Most*, 23(March), 1–77.
- Rust, L., Pesci, E. C., y Iglewski, B. H. (1996). Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) regulatory region. *Journal of bacteriology*, 178(4), 1134–1140.
- Schuster, M., y Greenberg, E. P. (2007). Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *Bmc Genomics*, 8(1), 287.
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T., y Greenberg, E. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of bacteriology*, 185(7), 2066–2079.
- Schuster, M., Urbanowski, M., y Greenberg, E. P. (2004). Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(45), 15833–15839.
- Seed, P. C., Passador, L., y Iglewski, B. H. (1995). Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *Journal of Bacteriology*, 177(3), 654–659.
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., de Las Heras, A., ... Nickel, P. I. (2013). The standard european vector architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic acids research*, 41(D1), D666–D675.
- Soberón-Chávez, G., Aguirre-Ramírez, M., y Ordóñez, L. (2005). Is pseudomonas aeruginosa only “sensing quorum”? *Critical reviews in microbiology*, 31(3), 171–182.
- Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M. P., y Cocotl-Yañez, M. (2021). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas* : from molecular genetics to the market. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 136–146.
- Soto-Aceves, M. P., Cocotl-Yañez, M., Merino, E., Castillo-Juárez, I., Cortés-López, H., González-Pedrajo, B., ... Soberón-Chávez, G. (2019). 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*, *165*(4), 425–432.
- Soto-Aceves, M. P., Cocotl-Yañez, M., Servín-González, L., y Soberón-Chávez, G. (2021). The Rhl quorum-sensing system is at the top of the regulatory hierarchy under phosphate-limiting conditions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, *203*(5).
- Stevens, A., y Greenberg, E. (1999). Transcriptional activation by LuxR. *Cell-cell signaling in bacteria*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 231–242.
- Taylor, I. R., Paczkowski, J. E., Jeffrey, P. D., Henke, B. R., Smith, C. D., y Bassler, B. L. (2021). Inhibitor mimetic mutations in the *Pseudomonas aeruginosa* PqsE enzyme reveal a protein–protein interaction with the quorum-sensing receptor RhlR that is vital for virulence factor production. *ACS Chemical Biology*.
- Toder, D., Gambello, M., y Iglewski, B. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of *lasR*. *Molecular microbiology*, *5*(8), 2003–2010.
- Ventre, I., Ledgham, F., Prima, V., Lazdunski, A., Foglino, M., y Sturgis, J. N. (2003). Dimerization of the quorum sensing regulator RhlR: development of a method using EGFP fluorescence anisotropy. *Molecular microbiology*, *48*(1), 187–198.
- Venturi, V. (2006). Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS microbiology reviews*, *30*(2), 274–291.
- Wade, D. S., Calfee, M. W., Rocha, E. R., Ling, E. A., Engstrom, E., Coleman, J. P., y Pesci, E. C. (2005). Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, *187*(13), 4372–4380.
- Wang, T., Sun, W., Fan, L., Hua, C., Wu, N., Fan, S., . . . Yan, J. (2021). An atlas of the binding specificities of transcription factors in *pseudomonas aeruginosa* directs prediction of novel regulators in virulence. *Elife*, *10*, e61885.
- Whiteley, M., y Greenberg, E. (2001). Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *Journal of Bacteriology*, *183*(19), 5529.
- Winson, M. K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M., . . . Bycroft, B. W. (1995). Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*.

Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(20), 9427–9431.

Winsor, G. L., Griffiths, E. J., Lo, R., Dhillon, B. K., Shay, J. A., y Brinkman, F. S. (2016).

Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic acids research*, 44(D1), D646–D653.

Zaborin, A., Romanowski, K., Gerdes, S., Holbrook, C., Lepine, F., Long, J., . . . Righetti,

K. (2009). Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(15), 6327–6332.

Anexo 1: Genes regulados positivamente por LasR

Genes regulados positivamente por LasR
medio FDS+ (alto fosfato)

locus	Nombre	Descripción	log2 Fold Change	p-ajustada
PA1900	<i>phzB2</i>	Biosíntesis de fenazinas	-6.4759	1.30E-29
PA2515	<i>xylL</i>	cis-1,2-dihidroxiciclohexa-3,4-diene carboxilato deshidrogenasa	-6.1770	1.23E-25
PA2512	<i>antA</i>	Subunidad de dioxigenasa de antranilato	-5.6318	1.50E-32
PA2300	<i>chiC</i>	Quitinasa	-5.3904	1.23E-25
PA2069		Proteína hipotética	-5.2124	7.49E-27
PA1432	<i>lasI</i>	Síntesis de autoinductor 3-O-C12-HSL, Quorum sensing	-5.0199	3.62E-27
PA2514	<i>antC</i>	Dioxigenasa reductasa de antranilato	-4.9048	2.88E-17

Continúa en la página siguiente.

locus	Nombre	Descripción	log2 Fold Change	p-ajustada
PA1899	<i>phzA2</i>	Biosíntesis de fenazinas	-4.8986	1.86E-17
PA2513	<i>antB</i>	Subunidad de dioxigenasa de antranilato	-4.6166	2.14E-16
PA4206	<i>mexH</i>	Proteína de bomba de eflujo	-4.4925	1.81E-16
PA2570	<i>lecA</i>	Lectina	-4.4528	1.18E-11
PA3904	PAAR4	Subunidad de toxina	-4.4302	7.65E-05
PA3479	<i>rhlA</i>	Ramnosiltransferasa, síntesis de ramnolípidos	-4.3848	1.66E-11
PA3478	<i>rhlB</i>	Ramnosiltransferasa, síntesis de ramnolípidos	-4.2197	3.69E-15
PA2516	<i>xylZ</i>	Componente de 1,2-dioxigenasa de toluato	-4.1913	1.35E-13
PA1902	<i>phzD2</i>	Biosíntesis de fenazinas	-3.9215	1.67E-12
PA4142		Proteína hipotética	-3.9162	2.81E-15
PA2067		Proteína hipotética	-3.8417	2.06E-11
PA4208	<i>opmD</i>	Proteína de bomba de eflujo	-3.8321	2.78E-15
PA4215	<i>phzF1</i>	Biosíntesis de fenazinas	-3.7259	3.47E-12
PA4213	<i>phzD1</i>	Biosíntesis de fenazinas	-3.7022	2.85E-10
PA2068		Proteína hipotética	-3.6983	3.75E-13
PA4207	<i>mexI</i>	Proteína de bomba de eflujo	-3.6458	5.74E-13
PA4205	<i>mexG</i>	Proteína de bomba de eflujo	-3.6375	1.59E-09
PA1869		Proteína hipotética	-3.5698	3.47E-12

Continúa en la página siguiente.

locus	Nombre	Descripción	log2 Fold Change	p-ajustada
PA1904	<i>phzF2</i>	Biosíntesis de fenazinas	-3.5431	1.16E-11
PA2274		Proteína hipotética	-3.4624	5.21E-09
PA0865	<i>hpd</i>	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa	-3.4343	4.32E-10
PA0122	<i>rahU</i>	Aerolisina	-3.4218	1.44E-13
PA4210	<i>phzA1</i>	Biosíntesis de fenazinas	-3.4101	1.84E-06
PA3724	<i>lasB</i>	Elastasa	-3.3968	4.18E-12
PA4141		Proteína hipotética	-3.3618	1.11E-06
PA3477	<i>rhlR</i>	Proteína reguladora, Quorum sensing	-3.3417	1.05E-12
PA5460		Proteína hipotética	-3.3260	0.000308392
PA0852.1		Proteína hipotética	-3.2289	6.85E-06
PA1903	<i>phzE2</i>	Biosíntesis de fenazinas	-3.2261	1.05E-10
PA3361	<i>lecB</i>	Lectina	-3.2075	1.27E-08
PA2511	<i>antR</i>	Regulador de operón ant	-3.1451	5.10E-10
PA2066		Proteína hipotética	-3.0787	3.50E-08
PA3520		Proteína hipotética	-3.0760	0.002536504
PA4214	<i>phzE1</i>	Biosíntesis de fenazinas	-3.0715	9.97E-10
PA4216	<i>phzG1</i>	Biosíntesis de fenazinas	-3.0483	7.67E-08
PA2566		Proteína hipotética	-3.0099	2.64E-10
PA1871	<i>lasA</i>	Proteasa	-2.9760	7.99E-07
PA2682		Proteína hipotética	-2.9668	7.55E-07
PA1250	<i>aprI</i>	Inhibidor de proteasa alcalina	-2.9637	4.80E-08
PA2588		Proteína hipotética	-2.9446	1.95E-08

Continúa en la página siguiente.

locus	Nombre	Descripción	log2 Fold Change	p-ajustada
PA1906		Proteína hipotética	-2.9178	1.34E-06
PA2305	<i>ambB</i>	Síntesis de ácido L-2-amino-4metoxi-trans-3-butenoico	-2.9054	5.10E-10
PA1168		Proteína hipotética	-2.9054	0.017075739
PA2517	<i>xylY</i>	toluato 1,2-dioxigenasa	-2.8967	0.005280663
PA2565		Proteína hipotética	-2.7941	6.28E-06
PA4143		Proteína hipotética	-2.7857	5.44E-08
PA0154	<i>pcaG</i>	protocatechuate 3,4-dioxygenasa	-2.7830	0.000246794
PA1656	<i>hsiA2</i>	Proteína del H2-T6SS	-2.7798	1.75E-05
PA2591	<i>vqsR</i>	Proteína reguladora, Quorum sensing	-2.7448	6.90E-05
PA0852	<i>cbpD</i>	chitin-binding protein CbpD precursor	-2.7430	5.43E-08
PA4144		Proteína hipotética	-2.6567	7.31E-06
PA1905	<i>phzG2</i>	Biosíntesis de fenazinas	-2.6063	1.69E-06
PA0187		Proteína hipotética	-2.5666	0.02967028
PA1712	<i>exsB</i>	exoenzyme S synthesis protein B	-2.5452	0.000130691
PA1747		Proteína hipotética	-2.5039	0.000308953
PA1907		Proteína hipotética	-2.4600	1.03E-05
PA3476	<i>rhlI</i>	Síntesis de autoinductor, Quorum sensing	-2.4591	0.000308392
PA1131		Proteína hipotética	-2.4508	1.20E-05

Continúa en la página siguiente.

locus	Nombre	Descripción	log2 Fold Change	p-ajustada
PA2302	<i>ambE</i>	Síntesis de ácido L-2-amino-4metoxi-trans-3-butenoico	-2.4098	8.12E-07
PA2518	<i>xylX</i>	Subunidad de 1,2-dioxigenasa de toluato	-2.3822	0.001895998
PA1711	<i>exsE</i>	Proteína secretada por SST3	-2.3656	0.000172233
PA1431	<i>rsaL</i>	Proteína reguladora, Quorum sensing	-2.3632	5.57E-05
PA1251		Proteína hipotética	-2.3142	3.99E-05
PA0188		Proteína hipotética	-2.2912	0.02152543
PA0153	<i>pcaH</i>	Subunidad de protocatechuato 3,4-dioxigenasa	-2.2802	0.000682583
PA2275		Proteína hipotética	-2.2665	0.000103814
PA1710	<i>exsC</i>	Síntesis de exoenzima S	-2.2553	2.50E-05
PA2303	<i>ambD</i>	Síntesis de ácido L-2-amino-4metoxi-trans-3-butenoico	-2.1905	0.003192755
PA1246	<i>aprD</i>	Proteína de secreción de proteasa alcalina	-2.1746	0.000147691
PA1130	<i>rhlC</i>	Ramnosiltransferasa 2, síntesis de ramnolípidos	-2.1712	0.000111418
PA5220		Proteína hipotética	-2.1513	0.000130606
PA2193	<i>hcnA</i>	Sintasa de cianuro de hidrógeno	-2.1376	0.020070995

Continúa en la página siguiente.

locus	Nombre	Descripción	log2 Fold Change	p-ajustada
PA2587	<i>pqsH</i>	Síntesis del autoinductor PQS, Quorum sensing	-2.1131	0.001161678
PA1705	<i>pcrG</i>	Regulador en SST6	-2.0778	0.032789115
PA5162	<i>rmlD</i>	dTDP-4-dehidroramnosa reductasa, síntesis de ramnolípidos	-2.0694	5.54E-05
PA1901	<i>phzC2</i>	Biosíntesis de fenazinas	-2.0370	0.000130606
PA2510	<i>catR</i>	Regulador transcripcional	-2.0370	0.002040015
PA2564		Proteína hipotética	-2.0219	0.000155815
PA1249	<i>aprA</i>	Precursor de metaloproteinasa alcalina	-1.9967	0.001161678
PA5161	<i>rmlB</i>	dTDP-D-glucosa 4,6-dehidratasa, síntesis de ramnolípidos	-1.9762	0.000471413
PA2519	<i>xylS</i>	Regulador transcripcional	-1.9484	0.035577164
PA1245	<i>aprX</i>	Proteína de secreción de proteasa alcalina	-1.9316	0.001197682
PA1707	<i>pcrH</i>	Proteína reguladora, SST3	-1.9281	0.026071765
PA1709	<i>popD</i>	Proteína translocadora, SST3	-1.8528	0.016997126
PA1247	<i>aprE</i>	Proteína de secreción de proteasa alcalina	-1.8424	0.004558202

Continúa en la página siguiente.

locus	Nombre	Descripción	log2 Fold Change	p-ajustada
PA3325		Proteína hipotética	-1.7900	0.018235208
PA0872	<i>phhA</i>	Fenilalanina-4-hidroxilasa	-1.7388	0.014761375
PA4209	<i>phzM</i>	Biosíntesis de fenazinas	-1.7256	0.008152449
PA2304	<i>ambC</i>	Síntesis de ácido L-2-amino-4metoxi-trans-3-butenoico	-1.6952	0.033973461
PA5163	<i>rmlA</i>	Glucose-1-fosfato timidiltransferasa, síntesis de ramnolípidos	-1.6951	0.003315687
PA4212	<i>phzC1</i>	Biosíntesis de fenazinas	-1.6835	0.00460566
PA1714	<i>exsD</i>	Antiactivador transcripcional, SST3	-1.6775	0.008091607
PA1706	<i>pcrV</i>	Proteína de secreción, SST3	-1.6708	0.041355371
PA1898	<i>qscR</i>	Proteína reguladora, Quorum sensing	-1.6260	0.03215205
PA2576		Proteína hipotética	-1.6100	0.038898527
PA0143	<i>nuh</i>	Purina nucleosidasa	-1.5505	0.038294857
PA4677		Proteína hipotética	-1.5352	0.045742594
PA3360		Proteína hipotética	-1.4833	0.048520065
PA1872		Proteína hipotética	-1.4604	0.034146534

Continúa en la página siguiente.

locus	Nombre	Descripción	log2 Fold Change	p-ajustada
--------------	---------------	--------------------	-----------------------------	-------------------

Tabla 8.1: Genes regulados positivamente por LasR (FDS+), se marcan con el mismo color genes relacionados en su función biológica. *lasR* fue el principal gen diferencialmente expresado ya que se comparó una cepa silvestre contra la mutante en *lasR*, dicho gen no se muestra en la tabla. SST6: Sistema de Secreción Tipo 6, SST3: Sistema de Secreción Tipo 3

Anexo 2: Genes regulados negativamente por LasR

Genes regulados negativamente por LasR
medio FDS+ (alto fosfato)

locus	Nombre	Descripción	log2 Fold Change	p-ajustada
PA0425	<i>mexA</i>	Proteína de bomba de eflujo	3.2195	1.88E-12
PA0427	<i>oprM</i>	Proteína de bomba de eflujo	3.1824	8.91E-13
PA0426	<i>mexB</i>	Proteína de bomba de eflujo	2.8692	2.37E-10
PA1634	<i>kdpB</i>	ATPasa, transporte de potasio	2.4736	0.033973461
PA0070	<i>tagQ1</i>	Proteína del SST6 (H1)	2.4174	0.009492939
PA0091	<i>vgrG1</i>	Proteína del SST6 (H1)	2.2029	0.028849011
PA4918	<i>pcnA</i>	nicotinamidasasa	2.1570	0.000461538
PA0078	<i>tssL1</i>	Proteína del SST6 (H1)	2.1270	0.028849011
PA0424	<i>mexR</i>	Regulador transcripcio- nal	2.0773	0.000589213

Continúa en la página siguiente.

locus	Nombre	Descripción	log2 Fold Change	p-ajustada
PA0090	<i>clpV1</i>	Proteína del SST6 (H1)	2.0753	0.045742594
PA3729		Proteína hipotética	2.0265	0.030324952
PA0132	<i>bauA</i>	Beta-alanine:piruvate transaminasa	1.5641	0.042010686

Tabla 8.2: Genes regulados negativamente por LasR (FDS+), se marcan con el mismo color genes relacionados en su función biológica. SST6: Sistema de Secreción Tipo 6

Anexo 3: Localización de cajas *las-rhl* putativas

Región río arriba de *mexA*

TATGGGCCATGGCGCCGGTGGATAACCGGCCATCGAGCTAAAACG
TTTCAGGTGTTTTCACGCGAGGCTTTCGGACGTTTACAACACCTA
TGAATGTAAGTATTTGCTGCT**TTCTTCGAGCCGGTGCAGCGCCT**
TCACGCTGCATCGGCCGCTTTCGCTCATGAGGACAACGCT**ATG**

Región río arriba de *antA*

AGCCGAGGGTGGTGCACATCGACTTCAGCACGTTGCCGTGG**TGCTGG**
AACTGCACCAGT**C**CCGGCTCGCCGCTTCGAGCCGGTGCAGCCGCA
GACCTTCGACATCCAGGAACGGCGCGGCCAGGTCCAGGTGGTCCG
CATGGAGATCGCCACGATCGCGCAGGGATGGGTCTCATCATGGTT
CGGCACTCGACACGGCAAGGCTGGGGTGCCTCTGCTGGCGCTCTG
TTTTCAGCAAATGCAAGGCATATCGCCGCGCAAGGCCGCTCCCG
CATCTCCACTATCCGGATAGCGTTTCGCCGACTTTCCGGACAAAGCG
TCCGCCGAAGCGCCGCTCGAACCTCGGCCGAGCCCTCCGCGAGCCC
CCGGCCGCTCCTCGCGGCTGCGGATTTTCGGGATGCGCATCGTCCG
ACTAAGCGGATAGCCCGCCCGCTCGCGGCCGTTGAATGGGTCAAC
CATAACGACAACGCACAAGGGTGAGAACGC**ATG**

Región río arriba de *antR*

GTTCGCTTTCGTGGCAGCGTAGATCCAG**TTCTTTTTCGAAGATCAGCT**
CCATCTCCAGGTCGAACAGT**C**CCGGTTCGGTGAACATGTCGGGGCGA
TGCGGAAGATGCCTTCTTCGGGACGGAAGTCGAGGCAGCCCGGACAT
AGTCGCGCCACTGTTCGAGGCTTTCGCCGGTAGCGTTTATGCGTTCTC
ACCCTTGTGCGTTGTCGTTATGGGTGACCCATTCAACGGCCGCGAGCG
GGGGGGGCTATCCGTTAGTCGACGATGCGCATCCCGAAAATCCGCA
GCCGCCGAGGAGCGCCGGGGGGCTCGCGGAGGGCTCGGCCGAGGTTTC
GAGCGCGCTTGCAGCGGACGCTTTGTCGGGAAAGTCGGCGAACGCTA
TCCGGATAGTGAGGATGCGGGGAGCCGGCTTGCGCCGCATATGCC
TTGCATTTTGTGAAAACAGAGCGCCAGCAGAGCGCACCCCCAGCCTT
GCCGTTCGAGTGCCGAAC**ATG**

Región río arriba de *xylX*

AGCAAGC**TGCTGACCCTGCTGAAGAC**CAACGTCAGCCGCGAGGACCCC
GGCGATGCGCAGGTGCTTTCGCCCGCTCGATGCCTACATCCGCCGC
CATCTGCAGAGCGAGATCGAGGTCGCGCGCTGGCCGAGCAGGCCAC
ATGAGCACCCGTTTCGCTGTACG**CGCTGTTTCGAGCGCCAGCT**TGGCGAG
AGCCCTCGGCAATACATTCGCGGGTGCAGCCTCGAGCGCATCCGCGCC
TGCC**TGGAAGACCCCGGCTGCCGGTACGCAACCTACCGAACTGGCC**
CTGGACTTCGGTTTCGCCACCTCGGCCGCTTCGCCGAGCAATATCGC
CGGCAGTTTCGGCGAGCTGCCTTCGGAAACCTCGCGCCGCGCGCTAG
CGCCGACCGCCACGGCGTGCAGGAATCGGCCAGCGATCCCGAGGCAAC
GGATATCCCAGCAGCACGCGCTACCTAACCTGACCGGGCCTGAACAA
TAACAACGGAGGCCCGGCC**ATG**

Región río arriba de *mexG*


AGACGATGGGGTAGCT**AAC**TGC**CCCCGGCAGGAG**TGCAATCGTCGCG
CAGCGGGTCGAGCGACAGTGTATGCCGGAAGGCGTCTCGCTCCAGGGG
GAACCGTCGCGACGGGTTGCCCGCAAGCTACACCCAGCCCTCCCCCA
ATAGTCCCCGCGACCAATCGTCAGCCCCTCATCCACCCGTCGCCGCGC
ACCAACGAATCCACCTGAAACCCAGCCAGCAAGGCTATAGCACTA
ATCAGACGCCCC**TG**ACCTCAACTTAAC**TTGAGGT**TTTATAGTCCCC
GCTGCGGTCATACCGCCCGTTTCCCCAGGACCACGAACCGCCCCAC
GGCCGCTTCGCGGCGCGGATGGCGACCAGCAAGGAACGACCC**ATG**

Figura 8.1: Cajas *las-rhl* putativas. Resaltadas en color se muestran las cajas putativas encontradas en la región río arriba de los genes *mexA*, *antA*, *antR*, *xylX* y *mexG*. En negritas se marcan los nucleótidos considerados invariables para cajas *las-rhl*.

Anexo 4: Artículo publicado



The Rhl Quorum-Sensing System Is at the Top of the Regulatory Hierarchy under Phosphate-Limiting Conditions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Martín Paolo Soto-Aceves,^a Miguel Cocotl-Yañez,^b Luis Servín-González,^a  Gloria Soberón-Chávez^a

^aDepartamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

^bDepartamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

ABSTRACT *Pseudomonas aeruginosa* is a major nosocomial pathogen that presents high-level resistance to antibiotics. Its ability to cause infections relies on the production of multiple virulence factors. Quorum sensing (QS) regulates the expression of many of these virulence factors through three QS systems: Las, Rhl, and PQS. The Las system positively regulates the other two systems, so it is at the top of a hierarchized regulation. Nevertheless, clinical and environmental strains that lack a functional Las system have been isolated, and, surprisingly, some of them still have the ability to produce virulence factors and infect animal models, so it has been suggested that the hierarchy is flexible under some conditions or with atypical strains. Here, we analyze the PAO1 type strain and its $\Delta lasR$ -derived mutant and report, for the first time, a growth condition (phosphate limitation) where LasR absence has no effect either on virulence factor production or on the gene expression profile, in contrast to a condition of phosphate depletion where the LasR hierarchy is maintained. This work provides evidence on how the QS hierarchy can change from being a strictly LasR-dependent to a LasR-independent RhlR-based hierarchy under phosphate limitation even in the PAO1 type strain.

IMPORTANCE *Pseudomonas aeruginosa* is an important pathogen, considered a priority for the development of new therapeutic strategies. An important approach to fight its infections relies on blocking quorum sensing. The Las system is the main regulator of the quorum-sensing response, so many research efforts aim to block this system to suppress the entire response. In this work, we show that LasR is dispensable in a phosphate-limited environment in the PAO1 type strain, which has been used to define the quorum-sensing response hierarchy, and that under this condition RhlR is at the top of the regulation hierarchy. These results are highly significant, since phosphate limitation represents a similar environment to the one that *P. aeruginosa* faces when establishing infections.

KEYWORDS LasR dispensability, *Pseudomonas aeruginosa*, RhlR-dependent regulation, antivirulence therapy, quorum-sensing hierarchy

Pseudomonas aeruginosa is a widespread bacterium (1, 2) that represents a deep concern in the medical field due to its intrinsic and acquired multidrug resistance (3) and the high incidence of its infections in immunocompromised individuals and cystic fibrosis (CF) patients (3). *P. aeruginosa* produces a variety of virulence factors, such as proteases (elastase and alkaline protease), pigments (pyocyanin and pyoverdinin), and exotoxin A, among others. The production of many of its virulence factors is controlled by quorum-sensing (QS) systems at the transcriptional level. These systems consist of two principal components: a signal molecule, which is produced constitutively at low cell densities and secreted, and a regulatory protein, which is only active

Citation Soto-Aceves MP, Cocotl-Yañez M, Servín-González L, Soberón-Chávez G. 2021. The Rhl quorum-sensing system is at the top of the regulatory hierarchy under phosphate-limiting conditions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 203:e00475-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00475-20>.

Editor George O'Toole, Geisel School of Medicine at Dartmouth

Copyright © 2021 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Gloria Soberón-Chávez, gloria@biomedicas.unam.mx.

Received 19 August 2020

Accepted 2 December 2020

Accepted manuscript posted online 7 December 2020

Published 8 February 2021

when bound to the signal molecule and activates transcription of its target genes. They are population dependent, since the autoinducer concentration is proportional to the number of bacterial cells, so they activate phenotypes that are biologically relevant when produced at high cell concentration.

P. aeruginosa harbors three QS systems (4) that have been studied mainly in the PAO1 and PA14 type strains, showing a close conservation of this regulatory network in these and other well-studied *P. aeruginosa* strains (4). The Las system consists of the LasR regulatory protein and LasI, which synthesizes the signal molecule *N*-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone (3O-C12-HSL). The Rhl system consists of the RhlR regulatory protein and the RhlI synthase of *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL). The PQS system consists of the PqsR regulatory protein and the signal molecules, which are, in this case, 2-alkyl-4 (1h)-quinolones (4-hydroxy-2-heptylquinoline [HHQ] and 2-heptyl-3,4-dihydroxyquinoline [PQS]) that are synthesized by the proteins encoded by the *pqsABCDE* and *phnAB* operons and the *pqsH* gene (5). These three systems are arranged in a hierarchized way, where the Las system positively regulates the Rhl and PQS systems. Nevertheless, several reports where Las-defective strains are capable of producing virulence factors led to propose scenarios where the QS hierarchy is flexible (6–11). The high frequency of *lasR* mutants is particularly apparent among CF isolates (10), and one of these isolates has been shown to produce QS-regulated virulence factors using RhlR as the main transcriptional regulator (11). However, the altered QS hierarchy is mainly accepted to be representative of atypical strains, and, in the case of type strains, the absence of LasR has been associated with a delayed QS response (see Table S1 in the supplemental material), suggesting that the importance of LasR lies in the timing of the QS system activation (6, 7).

Phosphate limitation is a common stress condition that *P. aeruginosa* faces when establishing an infection, since the availability of phosphate in a healthy person is low (1.25 mM) and is even lower (<0.03 mM) in patients on chemotherapy or who have undergone a recent surgery (12–14). Furthermore, this stress condition is relevant, since it has been reported that virulence factor production is enhanced at low phosphate concentrations (13–15), especially for pyocyanin, which, besides being a toxin, is considered a terminal signaling factor of the QS cascade (16, 17). It has been proposed that phosphate limitation leads to the activation of a *P. aeruginosa* hypervirulent phenotype (18).

PhoB is the regulator protein that the PhoR kinase phosphorylates when phosphate is scarce. When PhoB is phosphorylated, it can regulate the transcription of its target genes by direct binding to the *pho* box (19). In *P. aeruginosa*, putative *pho* boxes have been located in some QS genes, such as *rhlR* and *lasR* (15), suggesting that phosphate availability influences QS.

As mentioned above, the production of the phenazine pyocyanin is enhanced under phosphate limitation. Pyocyanin production depends on the Las system, which positively regulates the Rhl system that then activates the transcription of both of the redundant operons *phzA1B1C1D1E1F1G1* (*phz1*) and *phzA2B2C2D2E2F2G2* (*phz2*) (20). The enzymes encoded by these operons are involved in the synthesis of the pyocyanin precursor phenazine-1-carboxylic acid (PCA) (21). Thus, the enhanced production of pyocyanin could be explained by PhoB-dependent *rhlR* expression.

In this work, we analyze the role of the Las and Rhl QS systems in virulence factor production and its control by the PhoB regulator under low and sufficient phosphate conditions using the PAO1 type strain as a model. We determined whether the QS hierarchy described previously for this type strain under nonstressed conditions applies to this nutrient-limited environment. Our results show that while under phosphate depletion LasR is indispensable to activate QS response, under phosphate limitation this regulator is completely dispensable, with RhlR at the top of the QS hierarchy. In addition, we show that under phosphate limitation, PhoB directly activates *rhlR* transcription and that the global transcription pattern of the PAO1-derived *lasR* mutant is indistinguishable from that of the PAO1 strain under phosphate-limited conditions. This

phenomenon of global LasR dispensability is supported by the fact that elastase LasB, a classical LasR target, becomes dependent only on the Rhl system under this condition.

RESULTS

Pyocyanin is overproduced under a low-phosphate condition. To characterize the effect of phosphate limitation on *P. aeruginosa* PAO1 pyocyanin production, low-phosphate (FDS) and sufficient-phosphate (FDS+) media containing 0.5 mM and 4.5 mM K_2HPO_4 , respectively, were used to culture this bacterium. The growth in FDS was slightly lower, but this was not statistically significant (see Fig. S1 in the supplemental material).

We found that pyocyanin production was higher in FDS than FDS+ medium. This was evident from 16 h of growth (Fig. S2a), and at 24 h the level was eight times higher (Fig. S2b). This correlates with previous reports (14, 15) that proposed that this higher production can be explained by the regulation that PhoB exerts on *rhIR* transcription (15).

To determine whether rhamnolipids, a virulence-associated trait that is mainly dependent on RhlR/C4-HSL activity (22), were also overproduced in low-phosphate FDS medium, we detected these biosurfactants by thin-layer chromatography (TLC). We found that rhamnolipids were also overproduced in FDS (Fig. S2c), a result consistent with a previous report in which enhanced swarming, a rhamnolipid-related phenotype, was observed under phosphate limitation (23).

Taken together, these results suggest that under low-phosphate conditions, the production of RhlR-dependent phenotypes is increased.

PhoB directly regulates *rhIR* transcription. As mentioned above, the observed overexpression of the two phenotypes analyzed under the low-phosphate condition, pyocyanin and rhamnolipid production, can be explained by an increased expression of RhlR, as previously reported for the SCV 20265 strain (15). In that report, however, the phenomenon was observed at very late culture times of growth (38.5 and 45 h). Thus, we used an *rhIR'* *lux* transcriptional fusion to evaluate its expression in PAO1 cultured in FDS and FDS+ at earlier points in the stationary phase (18 to 24 h) (Fig. S3) and found, in accordance with this hypothesis, an increased expression in this period (Fig. S3), with 22 h being the time of highest increase of *rhIR* expression (Fig. S3), nearly doubling *rhIR* expression (Fig. 1a).

To test whether *rhIR* induction in low-phosphate medium was PhoB dependent, we first tested a *phoB* transcriptional fusion in FDS and FDS+ media to corroborate that the PhoR-PhoB system was more active under phosphate limitation. This fusion showed a four-times-higher activation on FDS than on FDS+ (Fig. 1a). We then evaluated the *rhIR* transcriptional fusion in a *phoB* mutant on FDS medium and found a reduced expression of about 40%, showing that *rhIR* transcription is partially PhoB dependent under low-phosphate conditions. Moreover, complementation of the *phoB* mutant with *phoB* in *trans* restored its expression (Fig. 1b). A putative *pho* box has been reported within the *rhIR* promoter region (14) (Fig. S4), so it has been proposed that *rhIR* regulation by PhoB is direct. To test this hypothesis, we performed an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using purified PhoB. This assay suggested a direct interaction, since the migration of a DNA fragment containing the *rhIR* promoter region is delayed in the presence of PhoB (Fig. 1c).

LasR expression is not affected by phosphate limitation. The existence of a putative *pho* box within the *lasR* promoter region has been reported (15) (Fig. S4), suggesting that PhoB could also regulate *lasR* in response to phosphate limitation. To test this, a *lasR'* *lacZ* fusion was evaluated in PAO1 grown in low-phosphate FDS and high-phosphate FDS+ media at 22 h. We found that its expression remained at the same level in both media (Fig. S5). This assay was also evaluated at the beginning of the stationary phase (16 h) (not shown), leading to the same conclusions. These results suggest that *lasR* is not subject to significant regulation by phosphate availability.

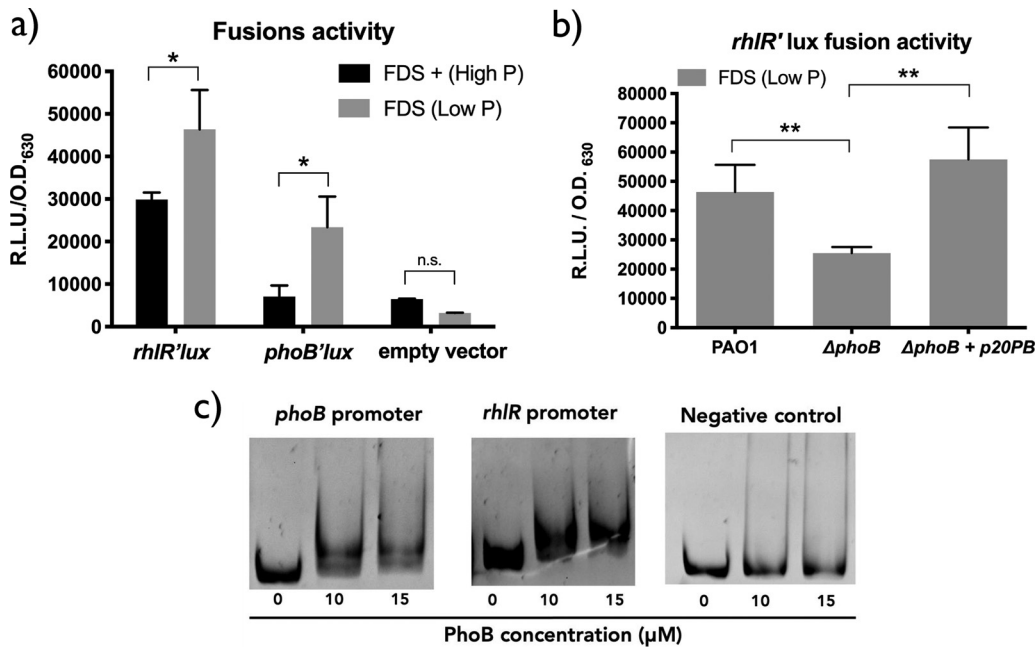


FIG 1 *rhIR* transcription is induced under low-phosphate conditions by PhoB. (a) *rhIR* and *phoB* transcriptional fusion activity in FDS+ and FDS media in PAO1 cultured for 22 h. R.L.U., relative light units. (b) *rhIR* transcriptional fusion activity in FDS+ and FDS media in PAO1, its *phoB* mutant (harboring empty vector pUCP20), and the complemented mutant (harboring p20PB). The results shown are the means from three biological replicates, and error bars denote the standard deviations. Asterisks indicate statistical significance by *t* test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). n.s., nonsignificant. (c) PhoB EMSA with *rhIR* promoter fragment. *phoB* promoter fragment was used as a positive control, and a structural sequence (see Materials and Methods) was used as the negative control.

Pyocyanin production under a low-phosphate condition is LasR independent.

The observation that *lasR* expression is not subject to phosphate regulation through PhoB (Fig. S5), in contrast to *rhIR* expression (Fig. 1a), led us to hypothesize that under low-phosphate conditions, the Rhl system is determinant for the QS system response, but the role of the Las and Pqs systems was not clear. To determine the relevance of the QS systems in pyocyanin overproduction under this condition, *lasR*, *rhIR*, and *pqsR* mutants were grown in FDS and FDS+ media.

In FDS+ medium, pyocyanin was detected only in the wild-type strain (Fig. 2). This result is in accordance with the reported QS regulation cascade in which the three systems have a role in pyocyanin production, since (i) the Las system activates the Rhl sys-

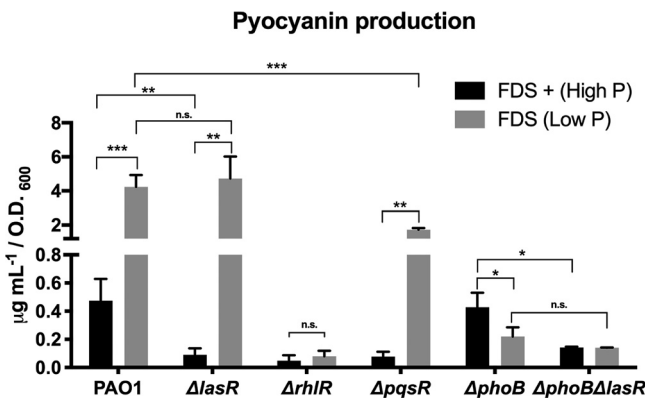


FIG 2 RhIR-dependent pyocyanin production under low-phosphate conditions is independent of LasR activity. Quantification of pyocyanin production by PAO1 and its isogenic *lasR*, *rhIR*, *pqsR*, *phoB*, and *phoB-lasR* mutants. The results shown are the means from three biological replicates, and error bars denote the standard deviations. Asterisks indicate statistical significance by *t* test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). n.s., nonsignificant.

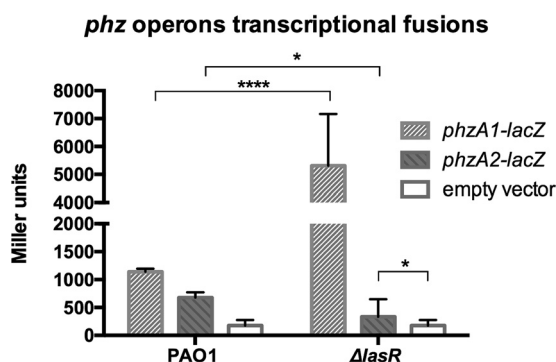


FIG 3 Increased pyocyanin production under low-phosphate conditions in the absence of LasR is only due to the expression of the *phz1* operon. Transcriptional fusion activity of *phzA1* and *phzA2* promoters of PAO1 and the *lasR* mutant grown in low-phosphate FDS medium. The results shown are the means from three biological replicates, and error bars denote the standard deviations. Asterisks indicate statistical significance by *t* test (*, $P < 0.05$; ****, $P < 0.0001$). n.s., nonsignificant.

tem (24, 25), (ii) the Rhl system is a positive regulator of the *phz* operons (20), and (iii) the Pqs system regulates pyocyanin production through PqsE, acting on RhlR activity (5).

Surprisingly, in low-phosphate FDS medium, pyocyanin was overproduced not only by the wild-type strain but also by the *lasR* mutant at practically the same levels (Fig. 2). This suggests that under low-phosphate conditions LasR is dispensable for pyocyanin production, while RhlR is still indispensable. The *pqsR* mutant was still able to produce about 50% of the pyocyanin produced by PAO1 (Fig. 2). This result confirms the importance of this system in pyocyanin production but suggests that it is not indispensable, since pyocyanin production is still possible in its absence.

Additionally, to assess the relevance of PhoB regulation, the *phoB* mutant was also evaluated. In FDS+ it produced levels similar to those of the PAO1 strain, as expected, since PhoB is inactive in this medium (Fig. S3). However, in FDS the *phoB* mutant was unable to overproduce pyocyanin (Fig. 2), evidencing the relevance of PhoB under this condition. In line with this, the *lasR-phoB* double mutant showed an affected production in FDS+, comparable to that of the *lasR* single mutant, since in this medium LasR is relevant but PhoB is inactive. On the other hand, in FDS, the production of the *lasR-phoB* mutant was similar to that of the *phoB* single mutant, since, under this condition, LasR is irrelevant and PhoB is active (Fig. 2).

Taken together, these results support the hypothesis that, under low-phosphate conditions, PhoB regulates RhlR, which becomes the main QS regulator for pyocyanin production, while LasR is dispensable.

The expression of the *phz1* operon is mainly responsible for LasR-independent pyocyanin production. To determine whether both *phz* operons contribute to LasR-independent pyocyanin production, transcriptional *lacZ* fusions to both promoter regions were evaluated in the *lasR* mutant grown in FDS and FDS+ media. In FDS+, no detectable activation of either operon was observed, correlating with the absence of pyocyanin production (Fig. 2). In FDS, the *phz1* operon promoter showed high transcription levels, while the *phz2* operon promoter showed only a slight activity (Fig. 3). These results suggest that the LasR-independent pyocyanin production relies on transcription of the *phz1* operon, which is directly regulated by RhlR (20), so its induction could be explained by RhlR overexpression in this medium.

LasR is globally dispensable under a low-phosphate condition. Since LasR turned out to be dispensable for pyocyanin production when the PAO1 strain was cultivated in low-phosphate FDS medium, we wondered whether this also applied to other QS-dependent phenotypes. To test this with another well-characterized RhlR-dependent phenotype (26), we visualized rhamnolipid production by TLC of the *lasR* mutant grown in FDS and FDS+ media. While in FDS+ medium rhamnolipids were not detected, in FDS they were produced at a lower but significant level in the *lasR*

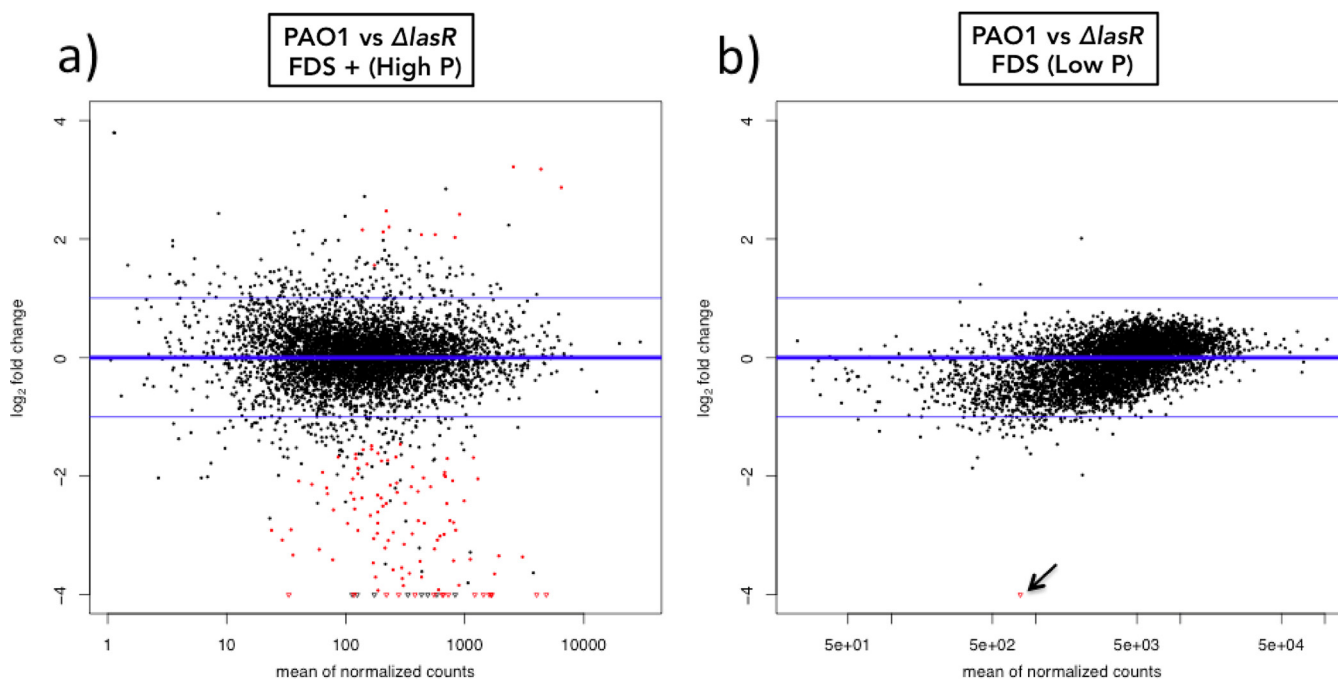


FIG 4 LasR transcriptional activity is not significant under low-phosphate conditions. MA plots based on DESeq2 differentially expressed genes. This plot represents each gene with a dot. The x axis is the average expression over the mean of normalized counts, and the y axis is the log₂ fold change between conditions. Genes declared as differentially expressed are highlighted in red. (a) Comparison of gene expression between PAO1 and the *lasR* mutant grown in high-phosphate FDS+ medium. (b) Comparison of gene expression levels between PAO1 and *lasR* mutant grown in low-phosphate FDS medium. The point indicated with the arrow represents *lasR*, which naturally was the only statistically differentially expressed gene.

mutant compared to the level in the wild-type strain (Fig. S6). This led us to hypothesize that LasR dispensability under a low-phosphate condition was not restricted to pyocyanin production and could be a global effect.

To assess this question, a transcriptome sequencing (RNA-seq) analysis of the wild-type and *lasR* mutant strains grown in FDS and FDS+ media was performed. Comparison between the transcriptome of both strains in FDS+ medium showed 106 downregulated genes in the *lasR* mutant (Fig. 4a), which includes genes that are well-known targets of LasR positive regulation, such as *lasI* and *rhIR*.

We also found that the main contribution of LasR is as a transcriptional activator, since there are only 12 genes that are negatively regulated by LasR (Table 1 and Table S2); 4 of these 12 genes belong to the same efflux system (*mexAB-oprM* operon and *mexR*). The regulation of MexA by LasR has also been observed in a recent report (27). It has been suggested that 3O-C12-HSL is a substrate of this MexAB-OprM efflux pump (28). Thus, the biological significance of the LasR negative regulation of this pump could be in maintaining high concentrations of this signal molecule to favor Las system activity.

The comparison between PAO1 and its *lasR* mutant in FDS medium, surprisingly, showed no statistically significant differentially expressed genes (Fig. 4b). This conclusion is sustained by three statistical programs used to analyze the results (DESeq, edgeR, and limma-vomm) showing log fold change correlation values of >0.9956 and correlation *P* values of >0.9356 between each comparison method. These results show that LasR becomes dispensable under a low-phosphate condition not only for pyocyanin and rhamnolipid production but also at a global level. Thus, we can conclude that in the PAO1 type strain, which is representative of the canonical QS response, under low-phosphate conditions the classical hierarchy is not conserved, since expression of QS-dependent genes becomes LasR independent and solely dependent on RhIR.

Elastase production under a low-phosphate condition is LasR independent. To assess the global LasR dispensability in a well-characterized LasR-dependent

TABLE 1 Main differentially expressed genes in the *lasR* mutant compared to PAO1^a

Locus and regulation status in <i>lasR</i> mutant	Gene	Log ₂ fold change	P value
Downregulated			
PA1900	<i>phzB</i>	-6.4759458	4.60E-33
PA2515	<i>xylL</i>	-6.177013216	1.22E-28
PA2512	<i>Anta</i>	-5.631837667	2.65E-36
PA2300	<i>chiC</i>	-5.390440529	1.30E-28
PA2069	Probable carbamoyl transferase	-5.212351705	5.29E-30
PA1432	<i>lasI</i>	-5.019915647	1.92E-30
PA2514	<i>antC</i>	-4.904814066	4.58E-20
PA1899	<i>phzA</i>	-4.898585114	2.63E-20
PA2513	<i>antB</i>	-4.616625506	4.17E-19
PA4206	<i>mexH</i>	-4.492450527	3.20E-19
PA3479	<i>rhIA</i>	-4.384775865	8.20E-14
PA3724	<i>lasB</i>	-3.396848792	1.85E-14
PA3477	<i>rhIR</i>	-3.341738031	3.72E-15
PA2591	<i>vqsR</i>	-2.744781033	7.81E-07
PA3476	<i>rhII</i>	-2.459061252	4.13E-06
PA1431	<i>rsaL</i>	-2.363228919	6.20E-07
Upregulated			
PA0090	<i>clpV1</i>	2.075320352	0.000953813
PA0424	<i>mexR</i>	2.077265258	8.33E-06
PA0078	<i>tssL1</i>	2.127012507	0.000530181
PA4918	<i>pcnA</i>	2.15701244	6.36E-06
PA0091	<i>vgrG1</i>	2.202895755	0.000525718
PA0070	<i>tagQ1</i>	2.417410024	0.000159362
PA1634	<i>kdpB</i>	2.473555242	0.000660378
PA0426	<i>mexB</i>	2.869241451	1.30E-12
PA0427	<i>oprM</i>	3.182374754	2.99E-15
PA0425	<i>mexA</i>	3.219524718	7.30E-15

^aThe 10 most upregulated and downregulated genes are shown. Shaded lines represent additional loci that are important, well-characterized LasR-dependent genes. The values shown correspond to DESeq2 analysis. No gene was statistically differentially expressed compared to levels in low-phosphate FDS medium.

phenotype, we measured the LasB elastase activity in both media. In FDS+, the activity was very low and the absence of either *lasR* or *rhIR* affected elastase activity (Fig. 5a). This was expected, since it has been reported that both regulators partially activate *lasB* expression in rich medium (9). Nevertheless, in FDS, this phenotype becomes LasR independent, and it depends exclusively on RhIR (Fig. 5b). Furthermore, the absence of *phoB* only affected this phenotype in FDS medium, as under this condition it is active and positively regulates *rhIR* expression. These results confirm the dispensability of

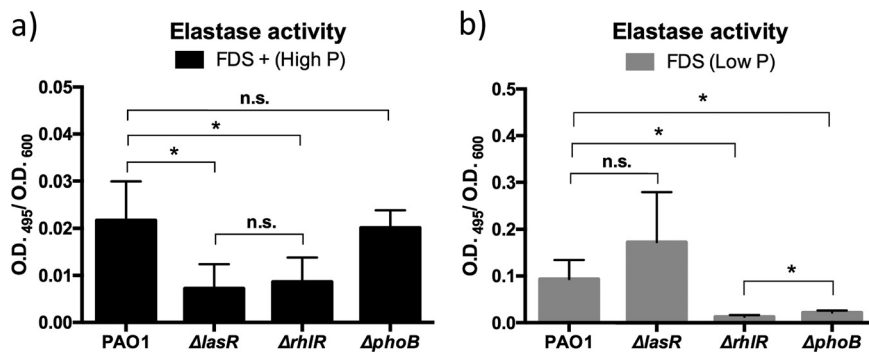


FIG 5 Elastase activity of PAO1 and its derived mutants. Quantification of elastase activity by PAO1 and its isogenic *lasR*, *rhIR*, and *phoB* mutants are shown. (a) FDS+ medium. (b) FDS medium. The results shown are the means from three biological replicates, and error bars denote the standard deviations. Asterisks indicate statistical significance by *t* test (*, *P* < 0.05). n.s., nonsignificant.

LasR under low-phosphate conditions due to the newly established hierarchy where RhIR is at the top of the QS response.

DISCUSSION

QS-dependent regulation of virulence factor production under phosphate limitation. As we have shown here, elastase LasB, an important LasR target, becomes LasR independent under a low-phosphate condition. In line with this, a recent report demonstrated that PhoB can bind the *lasI* promoter and activate its transcription (29). This supports the idea that LasR becomes dispensable even for the regulation of *lasI*, its main target gene. The LasR-independent regulation of *lasI* was previously reported, as it has been suggested that RhIR can induce *lasI* transcription in a heterologous *Escherichia coli* system (8). Nevertheless, under low-phosphate conditions, the biological relevance of the regulation that PhoB exerts on *lasI* might not have a great impact, since the concentration of 3O-C12-HSL is only slightly affected (29).

The synthesis of pyocyanin depends on the expression of enzymes encoded by the redundant operons *phz1* and *phz2*, which synthesize the pyocyanin precursor PCA, subsequently transformed by PhzM and PhzS to pyocyanin (21). The classical QS control of pyocyanin synthesis implies that LasR coupled with 3O-C12-HSL activates *rhIR* and *rhII* transcription, and then RhIR/C4-HSL positively regulates both *phz* operons (30), although only the *phz1* operon has a predicted *las-rhl* box (31).

We have shown here that under phosphate-limited conditions, RhIR-dependent, LasR-independent pyocyanin production occurs, and this phenomenon depends mainly on the *phz1* operon, which shows high levels of transcription in the *lasR* mutant, while the *phz2* operon shows only a slight activation, even lower than the activity shown in the PAO1 wild-type strain. This difference could not be observed in the RNA-seq analysis due to the inability to distinguish between the transcripts coming from either operon due to the high nucleotide identity they share (>98%) (19).

RhIR directly activates transcription of the *phz1* operon, and there are reports that other transcriptional factors also act on the *phzA1* promoter. In this respect, it has been shown recently that PhoB can directly bind to the *phz1* operon (29). In addition, another element that participates in the regulation of the *phz* operons is RsaL, which has been shown to act as a negative regulator of the *phz1* operon (32) and a positive regulator of the *phz2* operon. Thus, the LasR-independent overexpression of pyocyanin under a low-phosphate condition can be caused not only by RhIR but also by PhoB and RsaL, as they can play a role in the regulation of *phz1*. However, our results suggest that the RhIR-dependent, LasR-independent induction under low-phosphate conditions of other QS-regulated phenotypes, such as rhamnolipid production, as well as the global dispensability of LasR under this stress condition, is mainly due to the LasR-independent *rhIR* expression.

Taken together, these results highlight the need for a new model for *P. aeruginosa* QS-dependent regulation of virulence factor production in phosphate limitation depending only on the Rhl system.

The flexibility of the QS hierarchy. *P. aeruginosa* is considered a major nosocomial pathogen; a better understanding of its virulence trait production is needed to design new strategies to control infections caused by this bacterium and especially those caused by the frequently isolated antimicrobial-resistant strains. The QS response is an important target for compounds that inhibit *P. aeruginosa* virulence, since it regulates the expression of many of the virulence factors produced by this opportunistic pathogen. The Las system was originally thought to be the main QS regulator and is still considered an important target for quorum-quenching (QQ)-based therapies (33, 34). Nevertheless, different works have provided evidence showing that under certain conditions in laboratory type strains (6–9) and isolates (11, 35–37), the Las system can be less relevant for QS activation. In Table S1 in the supplemental material, we have summarized some of the evidence reported in the literature of the flexible nature of the QS response of the PAO1 type strain, which is the strain used in this work, and PA14, which shows a very similar QS response (4). In these works, all performed under

conditions of phosphate depletion, LasR seems to be important only for the timing of the response, as the activation of QS-dependent phenotypes is affected by LasR at earlier times of growth and is unaffected at later times (8, 9). Nevertheless, in this work, we show that the LasR hierarchy relevance is maintained in the stationary phase in a high-phosphate medium (FDS+), since the absence of LasR has important effects on the phenotype and gene expression. On the other hand, in a low-phosphate medium (FDS), this LasR hierarchy seems to be irrelevant, since in the stationary phase its absence has no effect on the phenotype or on gene expression. These results expose a distinct pattern of how the LasR hierarchy acts and highlight the conclusion of different paths that can lead to LasR dispensability. It is important to note that our conclusions were reached by analyzing the PAO1 strain cultured in FDS+ at a time (18 to 22 h of growth) when the reported hierarchy of LasR as the master regulator is very clear, with cultivation at the same time points in FDS medium that show an RhlR-dependent hierarchy. It is possible that at later time points LasR dispensability could also be apparent even in the FDS+ medium, since at late stationary phase the QS response has been reported to be dependent on RhlR (8).

Occurrence and relevance of *lasR* mutants. An experimental evolution strategy has been used to select PAO1 *lasR* mutant derivatives that were still able to express RhlR-regulated virulence factors in casein broth (which is a high-phosphate condition), suggesting that the Las-independent production of virulence factors that we show to exist under low-phosphate conditions can be selected during the course of an infection (38). It is also possible that *lasR* mutants have increased antibiotic resistance due to the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump and, thus, are positively selected.

It has been recognized that *lasR* mutants are frequently involved in *P. aeruginosa* infections, particularly in CF patients (10). Since LasR is considered the main transcriptional regulator and the first in the QS hierarchy, this phenomenon has opened the question of how it is possible that mutants lacking the main QS regulator can establish an infection. Social cheaters have been proposed as an explanation for this phenomenon (39). Nevertheless, there are several reports showing that *P. aeruginosa lasR* mutants can be virulent *per se* (11, 35, 36, 40), and recently it has been shown that Las-defective, RhlR-proficient *P. aeruginosa* isolates do not constitute a phylogenetic group but can originate from different clades (41).

In this context, the results presented here indicate that under some conditions, such as low phosphate availability, the LasR regulator becomes dispensable because RhlR is the head of the QS regulatory cascade. This can explain the success of *lasR* emergent strains but also demonstrates that LasR dispensability is not exclusive to the atypical strains, since this can occur in the well-studied PAO1 type strain. This is relevant for *P. aeruginosa* health impact, as this stress condition could represent an environment similar to the one that this bacterium faces when establishing an infection, since it has been reported that under certain clinical scenarios, such as patients that have undergone surgeries, the phosphate level is extremely low (14).

To our knowledge, this is the first report showing that under a specific environmental condition, LasR becomes completely dispensable for the expression of the *P. aeruginosa* QS response, which becomes only RhlR dependent; thus, it has a significant scientific value but is also relevant for the design of therapeutic strategies that are based on the inhibition of QS-dependent virulence factor production.

MATERIALS AND METHODS

Microbiological methods. The strains and plasmids used in this work are shown in Table S3 in the supplemental material. In all experiments we used strain MPAO1, provided by the University of Washington, referred to as PAO1. Precultures were grown in LB broth. Antibiotics were used at the following concentrations: for *E. coli*, 200 μ g/ml carbenicillin (Cb), 15 μ g/ml tetracycline (Tc), and 30 μ g/ml streptomycin (Sm); for *P. aeruginosa*, 200 μ g/ml Cb, 120 μ g/ml Tc, and 200 μ g/ml Sm. FDS medium [20 ml/liter glycerol, 10 g/liter DL-alanine, 50 μ M iron(III) citrate, 0.1 M Na₂SO₄, 20 mM MgCl₂, 0.5 mM K₂HPO₄, pH 7.4] and FDS+ medium (same components, except 4.5 mM K₂HPO₄ was used) were used to analyze phenotypic traits as well as transcriptional and translational fusions and for the RNA extraction.

The FDS and FDS+ phosphate concentrations were set based on the levels used in previous reports (15, 19). Specifically, in FDS the concentration was even lower than that reported to maximize the differences, but the total density obtained in stationary phase, where QS is expressed, was not significantly affected (Fig. S1). Cultures were inoculated with washed cells at an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.1. The flasks were incubated with continuous shaking (225 rpm) at 37°C. No antibiotics were added to FDS and FDS+ media.

Determination of virulence factor production. Phenotypic traits were analyzed at 24 h of growth. Pyocyanin concentration and elastase activity were measured as reported previously (9). The pyocyanin concentration and elastase activity are divided by the optical density (600 nm) of the culture to avoid the growth difference effect. Statistical significance was determined by Student's *t* test ($P < 0.05$), performed with Prism 6 software from GraphPad. Rhannolipid thin-layer chromatography was performed as reported previously (9).

DNA manipulation and construction of mutants. Oligonucleotides used in this work are listed in Table S4. DNA was purified and manipulated by using standard techniques (42). All plasmids were routinely maintained in *E. coli* DH5 α and were introduced by electroporation into *P. aeruginosa* as described previously (43). The *phoB* deletion was generated by the construction and insertion of the pXPBa plasmid into the PAO1 or $\Delta lasR$ strain to obtain the $\Delta phoB$ and $\Delta phoB\text{-}\Delta lasR$ mutants, respectively. This plasmid insertion was followed by FLP-mediated cassette removal according to the protocol reported by Choi and Schweizer (44). pXPBa plasmid was constructed by cloning the *phoB* upstream and downstream flanking regions, with an apramycin resistance cassette in the middle, into the HindIII site of pEXGm18. The primers 6824 and 6825 were used to obtain the upstream *phoB* flanking region, while 6826 and 6827 were used to obtain the downstream *phoB* flanking region. Primers 9522 and 9523 were used to obtain the apramycin resistance cassette from pJJ773 (45). To complement the *phoB* mutant, the plasmid p20PB was constructed as follows. The structural sequence of *phoB* was obtained using oligonucleotides 3861 and 3862, and this fragment was cloned in pJET1.2/blunt to add restriction sites (XbaI and HindIII). Finally, the *phoB* coding sequence was cloned in pUCP20 in the restriction sites mentioned.

The *pqsR* mutant was generated with the same procedure but using the plasmid pEX-*pqsR*::Apra. This plasmid was constructed by cloning the *pqsR* upstream and downstream flanking regions, with an apramycin resistance cassette in the middle, into the HindIII site of pEXGm18. Oligonucleotides *pqsRup* and *pqsR5Aa* were used to obtain the upstream *pqsR* flanking region, while *pqsR3Aa* and *pqsRdown* were used to obtain the downstream *pqsR* flanking region.

Construction of transcriptional fusions. The *rhlR*'-*lux* (pMRRx) and *phoB*'-*lux* (pMPBx) plasmids were constructed by PCR amplification of each promoter region using the oligonucleotide pairs 1300-1301 and 2814-2815, respectively. The PCR products were cloned in the HindIII-PstI sites of mini-CTX-*lux* (46). *phzA1*'-*lacZ* (pLZA1z) and *phzA2*'-*lacZ* (pLZA2z) were constructed by PCR amplification of each promoter region using the oligonucleotide pairs 607-608 and 613-614, respectively. The PCR products were cloned in the XhoI-HindIII sites and XhoI-BamHI sites, respectively, in pLP170 (47).

Measurement of reporter fusion activity. β -Galactosidase activity of *phzA1*'-*lacZ*, *phzA2*'-*lacZ*, and *lasR*'-*lacZ* was measured using standard protocols (48). The activity of the *lux* transcriptional fusions was measured using cells cultured in flasks under the conditions stated in the text. Aliquots were put in 96-well black plates with clear bottoms, and luminescence measurements were made in the Synergy HT equipment (BioTek). Statistical significance was determined by Student's *t* test ($P < 0.05$) performed with Prism 6 software from GraphPad.

EMSA. The *rhlR* promoter fragment was obtained using primers 1300 and 1301. This fragment contains the four reported promoters and the putative *pho* box. The *phoB* promoter fragment used as a positive control was obtained using primers 2814 and 2815. The negative control was obtained using primers 4602 and 4603, which amplify a fragment within the *pqsD* gene. To express the PhoB protein, the plasmid pETPB was generated. pETPB was constructed by cloning the *phoB* structural gene into the BamHI and HindIII sites of pET21a (Novagene); the *phoB* structural gene was obtained by PCR amplification with oligonucleotides 8057 and 8058. PhoB-His was purified using the nickel-nitrilotriacetic acid spin kit (Qiagen) by following the provider's instructions. The DNA fragment and PhoB protein were incubated by following a protocol and with a buffer previously reported (18) using 80 ng of DNA and 0, 10, and 15 μ M PhoB. The reaction samples were incubated at room temperature for 30 min. Electrophoresis was performed using 6% polyacrylamide native gels in 0.5 \times Tris-buffered saline buffer at 10 mA for 2 h at 4°C. The gels were stained using ethidium bromide and visualized with UV light.

RNA extraction, sequencing, and analysis. For RNA extraction, three independent cultures of strain PAO1 and its *lasR* mutant derivative were grown in FDS and FDS+ media for 22 h. Cells were harvested by centrifugation, and RNA isolation was carried out using the TRIzol (Invitrogen)-based protocol. Total nucleic acids were treated with RNase-free DNase I (Thermo Fisher) until no PCR product was detected after 30 cycles using primers 8598 and 2492. RNA integrity was analyzed by gel electrophoresis. rRNA was depleted by subtractive hybridization with the RiboMinus transcriptome isolation kit-bacteria (Thermo Fisher). mRNA libraries for each of the three independent cultures of each strain were constructed using the TrueSeq stranded mRNA library preparation kit (Illumina) and sequenced in Illumina NextSeq 500 equipment with up to 10⁷ paired reads/sample. Differential expression was evaluated with packages DESeq2 1.22.1 (49), edgeR 3.24.1 (50), and limma-vommm 3.38.3 (51). Genes were considered differentially expressed if they showed a log₂ fold change above 1.5 and a false discovery rate-controlled *P* value below 0.05 (52).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 2.2 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

M.P.S.-A. is a doctoral student of Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and received a fellowship from CONACYT (CVU-741217). This research 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).

We thank Selene Garcia-Reyes for the construction of the PAO1 *pqsR* mutant.

REFERENCES

- Moradali MF, Ghods S, Rehm BHA. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 7:1–29. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>.
- Crone S, Vives-Flórez M, Kvich L, Saunders AM, Malone M, Nicolaisen MH, Martínez-García E, Rojas-Acosta C, Catalina Gomez-Puerto M, Calum H, Whiteley M, Kolter R, Bjarnsholt T. 2020. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS* 128:220–231. <https://doi.org/10.1111/apm.13010>.
- Gellatly SL, Hancock REW. 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 67:159–173. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>.
- Williams P, Cámara M. 2009. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 12:182–191. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.005>.
- García-Reyes S, Soberón-Chávez G, Cocotl-Yañez M. 2020. The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: pseudomonas quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *J Med Microbiol* 69:25–34. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001116>.
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03672.x>.
- Cabeen MT. 2014. Stationary phase-specific virulence factor overproduction by a *lasR* mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 9:e88743. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088743>.
- DeKimppe V, Deziel E. 2009. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155:712–723. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022764-0>.
- Soto-Aceves MP, Cocotl-Yañez M, Merino E, Castillo-Juárez I, Cortés-López H, González-Pedrajo B, Diaz-Guerrero M, Servín-González L, Soberón-Chávez G. 2019. 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* 165:425–432. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000778>.
- Feltner JB, Wolter DJ, Pope CE, Groleau M, Smalley NE, Greenberg EP. 2016. LasR variant cystic fibrosis isolates reveal an adaptable quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Soc Microbiol* 7:1–9. <https://doi.org/10.1128/mBio.01513-16>.
- Cruz RL, Asfahl KL, Van den Bossche S, Coenye T, Crabbe A, Dandekar AA. 2020. RhlR regulated acyl-homoserine lactone quorum-sensing in a cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 11:e00532-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00532-20>.
- Salem RR, Tray K. 2005. Hepatic resection-related hypophosphatemia is of renal origin as manifested by isolated hyperphosphaturia. *Ann Surg* 241:343–348. <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000152093.43468.c0>.
- Shor R, Halabe A, Rishver S, Tilis Y, Matas Z, Fux A, Boaz M, Weinstein J. 2006. Severe hypophosphatemia in sepsis as a mortality predictor. *Ann Clin Lab Sci* 36:67–72.
- Long J, Zaborina O, Holbrook C, Zaborin A, Alverdy J. 2008. Depletion of intestinal phosphate after operative injury activates the virulence of *P. aeruginosa* causing lethal gut-derived sepsis. *Surgery* 144:189–197. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2008.03.045>.
- Jensen V, Löns D, Zaoui C, Bredenbruch F, Meissner A, Dieterich G, Münch R, Häussler S. 2006. RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and -independent pathways. *J Bacteriol* 188:8601–8606. <https://doi.org/10.1128/JB.01378-06>.
- Dietrich LE, Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M, Newman DK. 2006. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 61:1308–1321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05306.x>.
- Meirelles LA, Newman DK. 2018. Both toxic and beneficial effects of pyocyanin contribute to the life cycle of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 110:995–1010. <https://doi.org/10.1111/mmi.14132>.
- Zaborin A, Romanowski K, Gerdes S, Holbrook C, Lepine F, Long J, Poroyko V, Diggle SP, Wilke A, Righetti K, Morozova I, Babrowski T, Liu DC, Zaborina O, Alverdy JC. 2009. Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:6327–6332. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813199106>.
- Bielecki P, Jensen V, Schulze W, Gödeke J, Strehmel J, Eckweiler D, Nicolai T, Bielecka A, Wille T, Gerlach RG, Häussler S. 2015. Cross talk between the response regulators PhoB and TctD allows for the integration of diverse environmental signals in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* 43:6413–6425. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv599>.
- Higgins S, Heeb S, Rampioni G, Fletcher MP, Williams P, Cámara M. 2018. Differential regulation of the phenazine biosynthetic operons by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Front Cell Infect Microbiol* 8:252. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00252>.
- Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney DM, 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. <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6454-6465.2001>.
- Grosso-Becerra MV, Croda-García G, Merino E, Servín-González L, Mojica-Espinosa R, Soberón-Chávez G. 2014. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by two novel RNA thermometers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:15562–15567. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402536111>.
- Blus-Kadosh I, Zilka A, Yerushalmi G, Banin E. 2013. The effect of *pstS* and *phoB* on quorum sensing and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 8:e74444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074444>.
- 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* 21:1137–1144. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.00063.x>.
- Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH. 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179:3127–3132. <https://doi.org/10.1128/jb.179.10.3127-3132.1997>.
- Soberón-Chávez G, Lépine F, Déziel E. 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:718–725. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0150-3>.
- Huang H, Shao X, Xie Y, Wang T, Zhang Y, Wang X, Deng X. 2019. An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun* 10:2931. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10778-w>.

28. Evans K, Passador L, Srikumar R, Tsang E, Nezezon J, Poole K. 1998. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180:5443–5447. <https://doi.org/10.1128/JB.180.20.5443-5447.1998>.
29. Meng X, Ahator SD, Zhang LH. 2020. Molecular mechanisms of phosphate stress activation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing systems. *mSphere* 5:e00119-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00119-20>.
30. Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. 2012. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 76:46–65. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05007-11>.
31. Whiteley M, Greenberg EP. 2001. Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J Bacteriol* 183:5529–5534. <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5529-5534.2001>.
32. Rampioni G, Schuster M, Greenberg EP, Bertani I, Grasso M, Venturi V, Zennaro E, Leoni L. 2007. RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 66:1557–1565. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.06029.x>.
33. O'Brien KT, Noto JG, Nichols-O'Neill L, Perez LJ. 2015. Potent irreversible inhibitors of LasR quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Med Chem Lett* 6:162–167. <https://doi.org/10.1021/ml500459f>.
34. Abelyan N, Grabski H, Tiratsuyan S. 2020. In silico screening of flavones and its derivatives as potential inhibitors of quorum-sensing regulator LasR of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Biol* 54:134–143. <https://doi.org/10.1134/S0026893320010021>.
35. Grosso-Becerra MV, Santos-Medellín C, González-Valdez A, Méndez JL, Delgado G, Morales-Espinosa R, Servín-González L, Alcaraz LD, Soberón-Chávez G. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics* 15:314–318. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-318>.
36. Morales E, González-Valdez A, Servín-González L, Soberón-Chávez 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. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx119>.
37. Cocotl-Yanez M, Soto-Aceves MP, González-Valdez A, Servín-González L, Soberón-Chávez G. 2020. Virulence factors regulation by the quorum-sensing and Rsm systems in the marine strain *Pseudomonas aeruginosa* ID4365, a natural mutant in lasR. *FEMS Microbiol Lett* 367:fnaa092. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa092>.
38. Kostylev M, Kim DY, Smalley NE, Salukhe I, Greenberg EP, Dandekar AA. 2019. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:7027–7032. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819796116>.
39. Sandoz KM, Mitzimberg SM, Schuster M. 2007. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15876–15881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705653104>.
40. Chen R, Déziel E, Groleau MC, Schaefer AL, Greenberg EP. 2019. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing variant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:7021–7026. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819801116>.
41. Martínez-Carranza E, García-Reyes S, González-Valdez A, Soberón-Chávez G. 2020. Tracking the genome of four *Pseudomonas aeruginosa* isolates that have a defective Las quorum-sensing system, but are still virulent. *Access Microbiol* 2:acmi000132. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000132>.
42. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
43. Cadoret F, Soscia C, Voulhoux R. 2014. Gene transfer: transformation/electroporation, p 11–15. *In Pseudomonas methods and protocols*. Humana Press, New York, NY.
44. Choi KH, Schweizer HP. 2005. An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMC Microbiol* 5:30. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-30>.
45. Gust B, Chandra G, Jakimowicz D, Yuqing TIAN, Bruton CJ, Chater KF. 2004. Lambda Red-mediated genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Adv Appl Microbiol* 54:107–128. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(04\)54004-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)54004-2).
46. Becher A, Schweizer HP. 2000. Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. *Biotechniques* 29:948–952. <https://doi.org/10.2144/00295bm04>.
47. Preston MJ, Seed PC, Toder DS, Iglewski BH, Ohman DE, Gustin JK, Goldberg JB, Pier GB. 1997. Contribution of proteases and LasR to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infections. *Infect Immun* 65:3086–3090. <https://doi.org/10.1128/IAI.65.8.3086-3090.1997>.
48. Miller JH. 1972. *Experiments in molecular genetics*, p 352–355. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
49. Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
50. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
51. Ritchie ME, Phipson B, Wu DI, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43:e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>.
52. Jimenez-Jacinto V, Sanchez-Flores A, Vega-Alvarado L. 2019. Integrative differential expression analysis for multiple experiments (IDEAMEX): a web server tool for integrated RNA-Seq data analysis. *Front Genet* 10:279. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00279>.