



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

“Estudio de la regulación de la síntesis de alquil-quinolonas y plicianina por el sistema Rsm y la proteína PqsE en *Pseudomonas aeruginosa* ID4365”

Tesis

Que para obtener el título de Licenciado en

Química Farmacéutico Biológica

PRESENTA

Misael Josafat Fabián Del Olmo

Tutor:

Dr. Miguel Cocotl Yáñez

Ciudad de México, 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Garza Velasco Raúl

VOCAL: Profesor: Dimitrova Dinkova Tzvetanka

SECRETARIO: Profesor: Cocotl Yañez Miguel

1er. SUPLENTE: Profesor: Martín Fuentes Ruth Edith

2° SUPLENTE: Profesor: Maldonado Manjarrez Luis Ángel

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. C.P. 04510



ASESOR DEL TEMA: DR. MIGUEL COCOTL YAÑEZ

(nombre y firma)



SUSTENTANTE (S): MISAEL JOSAFAT FABIÁN DEL OLMO

(nombre (s) y firma (s))

INVESTIGACIÓN REALIZADA GRACIAS AL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT) DE LA UNAM IA204221 Y FORDECYT- PRONACES 53366. AGRADEZCO A LA DGPA-UNAM POR LA BECA RECIBIDA.

Í N D I C E

Introducción.....	1
I. Marco teórico.....	4
1. Pseudomonas aeruginosa.....	4
2. Piocianina.....	5
2.1 Biosíntesis de piocianina	8
2.2. Regulación de la producción de piocianina	10
2.2.1 Sistemas de <i>Quorum sensing</i>	10
2.2.2 Sistemas de <i>quorum sensing</i> en <i>P. aeruginosa</i>	11
2.3.3 Sistema Rsm	16
4. Procedimiento Experimental.....	21
4.1 Procedimientos microbiológicos	21
4.2 Manipulación del ADN.....	24
4.3 Detección de la producción de alquil-quinolonas	27
4.4 Construcción de fusiones transcripcionales	28
4.5 Cuantificación de la actividad β -galactosidasa	29
4.6 Generación de las mutantes ID Δ pqsE e IDrsmA Δ pqsE	30
4.7 Cuantificación de piocianina.....	31
4.8 Cuantificación de proteína	31
5. Resultados y Discusión	32
5.1 RsmA regula la síntesis de alquil-quinolonas en la cepa ID4365	32
5.2 PqsE es esencial para la síntesis de piocianina en la cepa ID4365 pero no en la mutante en <i>rsmA</i>	41
6. Conclusiones.....	54
7. Referencias Bibliográficas	56

Introducción

La cepa ID4365 de *Pseudomonas aeruginosa* corresponde a un aislado ambiental del mar de la India que se caracteriza por presentar una alta producción de piocianina, en comparación con la cepa de referencia PAO1 (Grosso-Becerra et al., 2014). En un trabajo realizado en nuestro grupo de investigación se encontró que esta cepa es una mutante natural del sistema Las al presentar una mutación sin sentido en el gen *lasR*, lo que resulta en una nula funcionalidad de este sistema y con ello una baja producción de elastasa. No obstante, mientras la cepa de referencia PAO1 con una delección del gen *lasR* resulta en una disminución en la producción de factores de virulencia como ramnolípidos y piocianina, en medios enriquecidos como el medio Luria (LB), en la cepa ID4365 la producción se mantiene, lo que indica que los otros dos sistemas pueden seguir funcionando en ausencia del sistema Las.

En ese sentido, se encontró que en la cepa ID4365, el control de la producción de factores de virulencia por QS recae principalmente en el sistema Rhl, dado que la inactivación de *rhIR* abatió la producción de elastasa, ramnolípidos y piocianina. Por otro lado, también se encontró que el sistema Rsm está implicado en el control de la producción de estos tres factores de virulencia. La inactivación de *rsmA* disminuyó los niveles de ramnolípidos y de hecho se encontró que en la mutante en *rsmA* los niveles de RhIR se ven disminuidos, por lo que se concluye que RsmA funge como un regulador positivo de RhIR y de esa forma el sistema Rsm está vinculado a los sistemas de QS.

Respecto a la producción de piocianina, la mutación de *rsmA* resultó en un incremento de cuatro veces su producción, además de que la sobreexpresión de RsmA, pero no de RsmN, resultó en una disminución de la producción de esta fenazina, lo que concuerda con la regulación negativa de RsmA sobre la producción de piocianina reportado en otras cepas.

Sin embargo, a pesar de que RsmA resulta ser un regulador negativo de la producción de piocianina, también resulta ser indirectamente un regulador positivo de la misma al regular positivamente a *rhlR*. Esto implica que a pesar de presentarse una baja producción de RhlR en la mutante en *rsmA*, la poca producción de este factor de transcripción resulta suficiente para activar la producción de piocianina. Además, la producción podría verse favorecida a través de PqsE, sin embargo, esto aún no ha sido determinado.

No obstante, en un proyecto de investigación en curso y a través de un análisis proteómico realizado en la cepa mutante en *rsmA* de ID4365, se encontró que, en comparación con la cepa silvestre, los niveles de las proteínas PqsA y PqsE eran menores (Montelongo-Martínez tesis de doctorado). Además, un ensayo preliminar mostró que la producción de AQS se encuentra disminuida en la mutante en *rsmA*, por lo que se llegó a la hipótesis de que RsmA podría fungir como un regulador positivo del sistema Pqs y con ello también de la expresión *pqsE*.

Considerando que en cepas como PAO1 se ha reportado que PqsE es imprescindible para la producción de piocianina, surge una nueva hipótesis en el presente estudio. En la cepa ID4365, la delección de *rsmA* conduce a un aumento en la producción de piocianina, mientras que la expresión de los sistemas Pqs y Rhl disminuye, lo que

sugiere que en esta cepa en particular, PqsE podría no ser relevante para la producción de pirocianina, por lo que la delección de *pqsE* no tendría ningún efecto en la síntesis de este factor de virulencia. En el presente trabajo se pretende elucidar la regulación de RsmA sobre la síntesis de AQ, así como la relevancia de PqsE en la producción de pirocianina en la cepa ID4365 de *P. aeruginosa*.

I. Marco teórico

1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es la principal especie del género *Pseudomonas* a nivel clínico. Su nombre proviene de las palabras griegas “*Pseudo*”, que significa "falso", y “*monas*”, que significa "unidad simple" mientras que "*aeruginosa*" proviene del latín *aerūgō*, que significa "cobre oxidado", haciendo referencia al color verde azulado de las colonias de esta bacteria. Su morfología es de tipo bacilar Gram negativa con una disposición generalmente en pares, considerada como un aerobio facultativo dada su capacidad de utilizar nitratos o arginina como aceptor alternativo de electrones en condiciones de ausencia de oxígeno y generalmente móviles (Murray et al., 2013).

Pertenece a la clase gamma de las proteobacterias y filogenéticamente esta especie incluye diversas cepas que pueden ser clasificadas en sus cinco diferentes clados (García-Reyes et al., 2021). Es capaz de generar diversos procesos patológicos en plantas, insectos, parásitos y animales. En humanos es una de las principales bacterias de interés médico a nivel mundial, al estar relacionada con múltiples infecciones agudas o crónicas en pacientes con condiciones inmunodeficientes, como aquellos que presentan quemaduras graves, síndrome de inmunodeficiencia humana (SIDA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o fibrosis quística, por lo que es considerada como un patógeno oportunista. Su patogenicidad es producto de los múltiples factores de virulencia que produce, tales como ramnolípidos, elastasa y piocianina, que en conjunto favorecen la colonización de la bacteria en el hospedero (Diggle & Whiteley, 2020; Jurado-Martín et al., 2021).

La cepa PAO1 de *P. aeruginosa* fue la primera en ser secuenciada debido a que era ampliamente utilizada en investigaciones y estudios de laboratorios, por lo que actualmente se considera la cepa de referencia en el campo de la investigación (Stover et al., 2000). Esto permitió una mayor comprensión de la biología y la fisiología de esta bacteria, así como de su potencial como agente patógeno. Además, esta información ha sido importante para el desarrollo de estrategias terapéuticas y la prevención de infecciones causadas por este patógeno. Además de la cepa PAO1, la cepa PA14 se ha establecido como otra referencia ampliamente utilizada. Esta cepa, inicialmente aislada del medio ambiente, se caracteriza por su alta virulencia y su capacidad de causar extensa putrefacción en plantas. No obstante, se ha encontrado a esta cepa presente en pacientes con quemaduras (Diggle & Whiteley, 2020).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) catalogó a esta especie bacteriana como una de las urgentes para investigación y para desarrollo de nuevos antibióticos dado que, además de presentar resistencia intrínseca a cierto tipo de antibióticos, debido a la expulsión de estos por medio de bombas de eflujo a través de la membrana, en los últimos años ha ido en aumento el número de aislados clínicos multirresistentes a antibióticos, entre los cuales se incluyen a los carbapenémicos (Pang et al., 2019).

2. Piocianina

La piocianina es la principal fenazina entre las cuatro moléculas de este tipo sintetizadas por *P. aeruginosa*. Su estructura molecular se caracteriza por la presencia de un grupo metilo en la posición cinco y un grupo cetona o alcohol en la posición uno, dependiendo de si la molécula se encuentra en su estado oxidado o reducido, respectivamente (Gonçalves et al., 2021). Dependiendo de su estado redox, este

compuesto puede presentar su característico color azul-verdoso en su estado oxidado, o bien, ser incoloro en su estado reducido. No obstante, esta molécula también presenta propiedades ácido-base dada la protonación del grupo amino de la posición diez en un $\text{pH} < 4.9$, en el cual la coloración del compuesto cambia a un tono rojizo sin importar su estado redox (Figura 1).

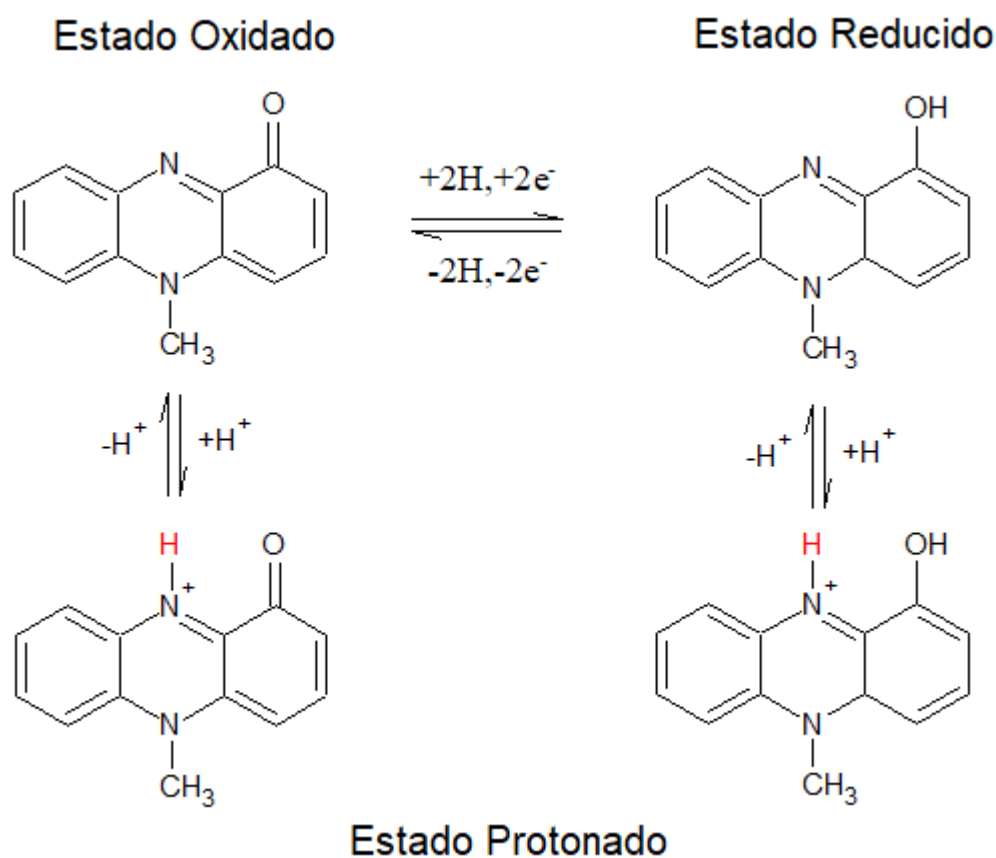


Figura 1. Diferentes estructuras de piocianina de acuerdo a su estado químico

Además, esta fenazina, en su estado oxidado o reducido y a pH fisiológico, es capaz de difundir a través de la membrana plasmática e interactuar con diferentes moléculas y componentes intracelulares; su propiedad redox es la base de su actividad biológica. Así, se ha determinado que la piocianina interacciona con NADH o NADPH como

aceptor de electrones, con lo cual se reduce y de esta forma, en condiciones aeróbicas, es capaz de transferir estos electrones al oxígeno molecular para formar especies reactivas del oxígeno, lo cual incrementa la concentración intracelular basal de éstas y conduce a un estado de estrés oxidativo a las células expuestas a esta fenazina (O'Malley et al., 2004).

Adicionalmente, la piocianina también es capaz de oxidar al glutatión, una molécula producida en respuesta al estrés oxidativo, para recuperar la homeostasis REDOX, dando como resultados radicales libres de piocianina y la formación del ion super oxido, lo que aumenta la condición de estrés oxidativo (O'Malley et al., 2004).

Además, también se ha observado que la piocianina es capaz de reducir Fe(III), lo cual facilita la adquisición de hierro, principalmente cuando este se encuentra formando complejos, como en la transferrina (Cox et al., 1986). Por otra parte, esta fenazina tiene la capacidad de aumentar la concentración intracelular de calcio en células eucariotas, lo que se ha relacionado con la activación de vías apoptóticas, así como la activación de proteínas pro-apoptóticas, como las de la familia Bcl-2, que finalmente dan lugar a la apoptosis celular (Li et al., 2019).

Así mismo, la piocianina participa en la formación de biopelículas a través de dos mecanismos, el primero de ellos involucra la muerte celular de la propia bacteria productora y la liberación del ADN extracelular (eADN), y la segunda a través de intercalarse con este eADN cambiando sus propiedades y favoreciendo así la agregación celular (Das et al., 2015; Hall et al., 2016).

En general, la piocianina es un compuesto crucial para *P. aeruginosa*, dado que sus actividades biológicas no solo facilitan la colonización del hospedero, sino también le brindan una ventaja competitiva sobre otros microorganismos en la lucha por los nutrientes del entorno. Además, se ha demostrado que la piocianina tiene propiedades antifúngicas y antibacterianas; estudios han revelado su actividad citotóxica en células tumorales, lo que la convierte en un potencial agente antitumoral (Gonçalves et al., 2021).

2.1 Biosíntesis de piocianina

Como ya se mencionó, la piocianina es solo una de cuatro fenazinas sintetizadas por *P. aeruginosa*. Estas moléculas heterocíclicas se caracterizan por tener en su anillo central dos átomos de nitrógeno; generalmente, dependiendo de en dónde presenten sustituyentes y sus condiciones externas, presentarán coloración.

La síntesis de estas moléculas depende de enzimas codificadas en dos operones redundantes presentes en el genoma de *P. aeruginosa* denominados *phzA1B1C1D1E1F1G1* (*phzA1-G1*) y *phzA2B2C2D2E2F2G2* (*phzA2-G2*), además de los genes *phzM*, *phzS* y *phzH* (Mavrodi et al., 2001) (Figura 2A). Como se muestra en la figura 2B, la ruta de síntesis comienza a partir de ácido corísmico, el cual proviene de la vía de Shikimato y no solo es utilizado para la síntesis de fenazinas, sino también funge como precursor de otros compuestos aromáticos, entre ellos los aminoácidos aromáticos, folatos y pioquelinas, por mencionar algunos (Herrmann & Weaver, 1999; Serino et al., 1997).

El corismato es convertido en ácido-fenazina-1-carboxílico (PCA) por las enzimas PhzA-G, codificadas en ambos operones previamente mencionados, y es tomado como sustrato por otras proteínas para dar lugar a la producción de las diversas fenazinas, siendo ésta la primera de cuatro. El PCA puede ser reconocido por la enzima PhzH y formar una amida en la posición uno del PCA, dando lugar a la fenazina-1-carboxamida (PCN). Por otro lado, el PCA también puede ser tomado como sustrato por PhzS y reducir el ácido carboxílico de la posición uno a un grupo alcohol, dando como resultado la formación de 1-hidroxifenazina (1-OH-PCA).

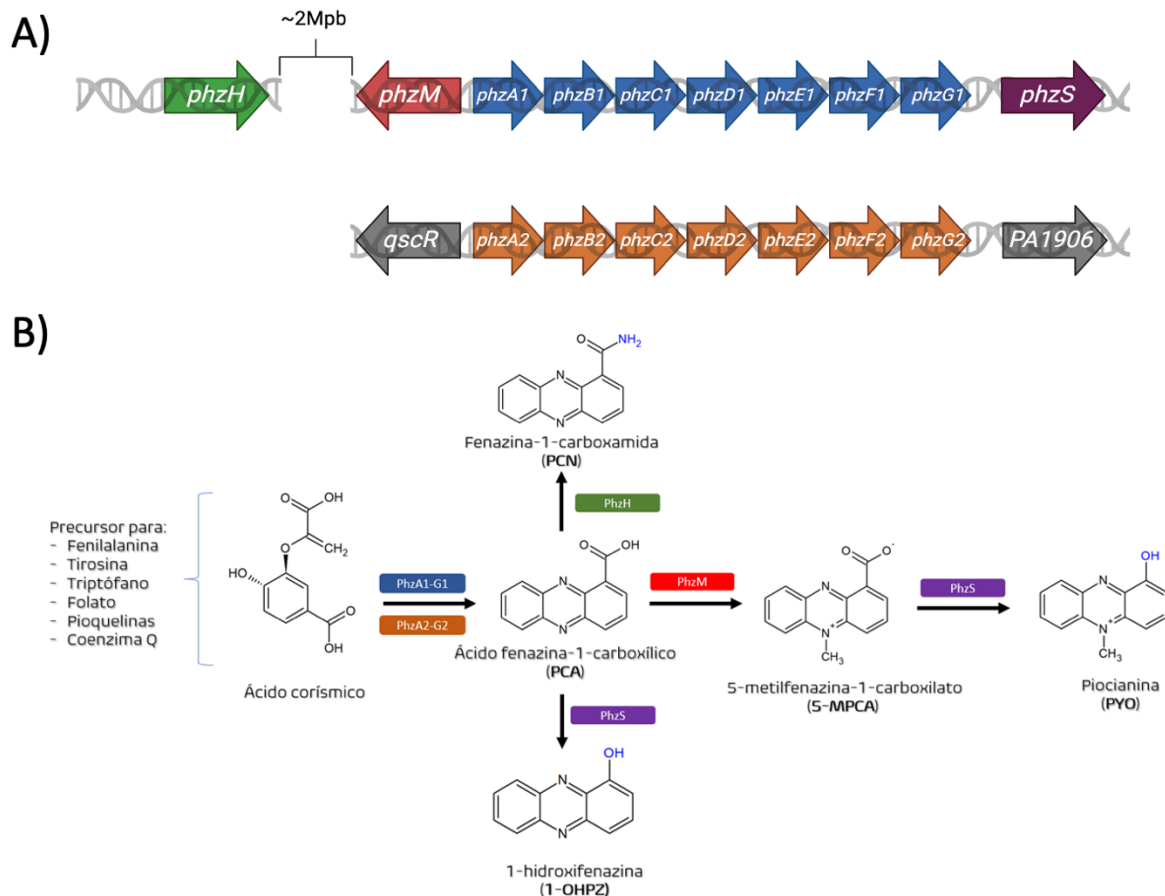


Figura 2. Biosíntesis de fenazinas en *P. aeruginosa*. A) Genes biosintéticos de fenazinas; B) Ruta biosintética de fenazinas.

Finalmente, el PCA también puede ser reconocido por la enzima PhzM, metilando a la molécula en la posición cinco, para dar lugar al 5-metilfenazina-1-carboxilato (5-metil-PCA), sin embargo, esta molécula es altamente oxidante por lo que resulta tóxica para *P. aeruginosa* (Sporer et al., 2018). Un mecanismo que elimina la toxicidad de 5-metil-PCA es ser biotransformado por la enzima PhzS, realizando la misma reacción de reducción del ácido carboxílico de la posición uno y con ello dar lugar a la síntesis de la piocianina (PYO) (Mavrodi et al., 2001). Este sistema biosintético está regulado a nivel transcripcional por los sistemas de *quorum sensing* y a nivel postranscripcional por el sistema Rsm (Cocotl-Yáñez et al., 2020).

2.2. Regulación de la producción de piocianina

2.2.1 Sistemas de *Quorum sensing*

Los sistemas de *quorum sensing* (QS) representan un mecanismo de comunicación utilizado por bacterias para coordinar la expresión génica en función de la densidad de la población celular. Fue descubierto y descrito hace más de veinticinco años en dos especies de bacterias marinas, *Vibrio fischeri* (*Aliivibrio fischeri*) y *Vibrio harveyi*, las cuales presentan una capacidad lumínica regulada por el operón estructural *luxCDABE*, cuya expresión se activa a altas densidades celulares, en respuesta a la acumulación de moléculas autoinductoras secretadas, lo que se traduce en la emisión de luz en estas especies.

Este descubrimiento llevó a la identificación del mecanismo de regulación de la expresión génica a través de la comunicación intercelular en bacterias, ahora denominado QS. Este requiere de moléculas orgánicas, denominadas

“autoinductores” (AI), que son producidas y liberadas por las bacterias y cuyas concentraciones externas aumentan de manera proporcional a la densidad celular. La detección de una concentración mínima de los autoinductores por parte de las bacterias, provoca intervenciones en la expresión génica, lo que les permite sincronizar comportamientos específicos a nivel de población y, con ello, funcionar como organismos multicelulares. Esto es fundamental para su supervivencia en diferentes ambientes y condiciones. Es importante mencionar que las diferencias en los sistemas de QS entre las diferentes especies de bacterias se deben a la optimización de estos sistemas para la supervivencia de cada especie en su nicho específico (M. B. Miller & Bassler, 2003; Waters & Bassler, 2005).

Existen tres tipos distintos de señales de QS utilizadas por las bacterias. Por lo general, las bacterias Gram-negativas utilizan acil-homoserina lactonas (AHL) como señal de QS, mientras que las bacterias Gram-positivas utilizan péptidos pequeños. No obstante, también se ha detectado a la molécula de señalización autoinductora-2 (AI-2) en ambos tipos de bacterias, lo que sugiere que podría ser una molécula de señalización universal que permite a las bacterias detectar a otras poblaciones bacterianas. Esta característica es importante para la comunicación intercelular entre las bacterias, debido a que les permite coordinar comportamientos específicos a nivel de población (Smith & Iglewski, 2003).

2.2.2 Sistemas de *quorum sensing* en *P. aeruginosa*.

Como ya se mencionó, los sistemas de QS son un mecanismo de comunicación utilizado por las bacterias para coordinar su expresión génica en función de la densidad de población celular. *P. aeruginosa* posee tres sistemas diferentes de QS: el sistema

Las, el sistema Rhl y el sistema Pqs, los cuales muestran generalmente un orden jerárquico en medio enriquecido (García-Reyes et al., 2020; Whiteley & Greenberg, 2001) (figura 3). En la cima de esta cascada regulatoria se coloca al sistema Las, cuya función depende de la síntesis de la molécula auto-inductora N-3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona (C-12) por parte de la sintasa LasI; su detección y acoplamiento al factor de transcripción LasR activa a éste y es capaz de acoplarse a su sitio específico en las regiones promotoras de diversos genes, y con ello favorecer su transcripción (García-Reyes et al., 2020).

Entre los blancos del sistema Las se encuentran principalmente genes asociados a factores de virulencia, a inhibidores del propio sistema Las como la proteína RsaL, y a otros sistemas de QS, como el sistema Pqs, y también al siguiente en esta jerarquía, el sistema Rhl. Al igual que en el sistema Las, la función del sistema Rhl depende de la síntesis de la molécula auto inductora N-butanoil-homoserina lactona (C-4) por parte de la sintasa Rhl y de su detección y acoplamiento al factor de transcripción RhlR, con lo cual este se activa y al acoplarse a su sitio específico en las regiones promotoras de sus genes blanco favorece su transcripción.

Entre los blancos del sistema Rhl se encuentran genes implicados en la producción de algunos factores de virulencia, en especial destacan los de la síntesis de piocianina. RhlR activa la transcripción de los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* además del gen *phzM* que son indispensables para la producción de piocianina (Higgins et al., 2018).

El tercer sistema de QS se denomina Pqs y, a diferencia de los sistemas Las y Rhl, este basa su función en la síntesis de moléculas de naturaleza alquil-quinolonas (AQs)

como la 2-heptil-3-hidroxi-1H-quinolin-4-ona (PQS) y la 2-heptil-1H-quinolin-4-ona (HHQ).

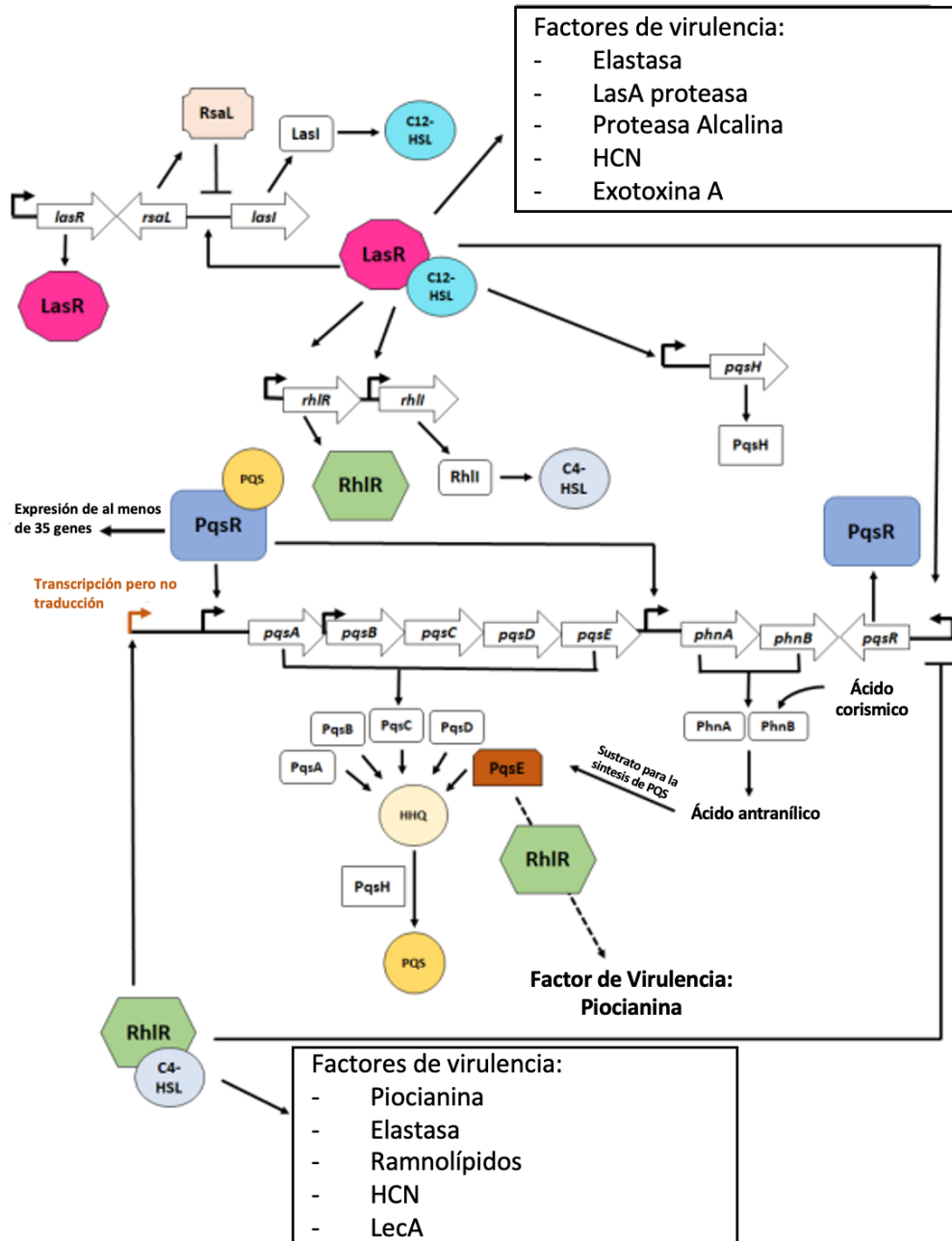


Figura 3. Sistemas de *quorum sensing* de *P. aeruginosa* (Modificado de García-Reyes, S. 2021).

La mencionada síntesis se realiza a través de la biotransformación del ácido antranílico por las enzimas codificadas en el operón *pqsABCDE*, y su detección y acoplamiento al factor de transcripción PqsR ocurre tanto con PQS como con HHQ. Cuando PqsR se activa, se favorece la transcripción de al menos treinta y cinco genes y del operón *pqsABCDE*, lo que aumenta la producción de Aqs (García-Reyes et al., 2020).

Cabe resaltar que este tercer sistema de QS denominado Pqs también está regulado por el sistema Rhl; sin embargo, a diferencia del sistema Las que regula positivamente al sistema Pqs, específicamente la transcripción de los genes *pqsR* y *pqsH*, el sistema Rhl lo regula de manera negativa, reduciendo la transcripción de *pqsR* y generando un transcrito largo no traducible del gen *pqsA* (Brouwer et al., 2014; García-Reyes et al., 2021; Schuster & Greenberg, 2006).

2.2.2.1 Sistema Pqs

Como ya se mencionó, el sistema Pqs es uno de los tres sistemas de QS cuyo funcionamiento depende de la síntesis y detección de auto inductores de tipo Aqs, los cuales requieren de una serie de enzimas para dar lugar a estas moléculas codificadas en los genes correspondientes a este sistema. En primera instancia se tiene al factor de transcripción PqsR, codificado en el gen con el mismo nombre, encargado de favorecer la transcripción de todos los genes de este sistema al tomar su forma activa por la unión con PQS o HHQ (García-Reyes et al., 2020).

Por otro lado, el operón *phnAB* tiene la función de generar el sustrato inicial para la síntesis de Aqs, denominado ácido antranílico, a partir del ácido corísmico. Este ácido antranílico es biotransformado mediante las enzimas codificadas en el operón

pqsABCDE y en el gen *pqsH*, como se muestra en la figura 4. La transformación comienza con la enzima PqsA, que convierte el ácido antranílico en antraniloil-CoA. Posteriormente, el antraniloil-CoA es condensado con malonil-CoA por la enzima PqsD, dando lugar a la 4-hidroxi-1H-quinolina-2-ona. Alternativamente, PqsD también puede condensar el antraniloil-CoA con malonil-CoA para formar 2-aminobenzoilacetil-CoA, el cual es hidrolizado por la enzima PqsE, que actúa como tioesterasa, para obtener 2-aminobenzoilacetato (2-ABA). Luego, 2-ABA se condensa con octanoil-CoA por el heterodímero PqsBC, produciendo HHQ. Finalmente, HHQ es hidroxilado por la monooxigenasa PqsH en condiciones aeróbicas, lo que resulta en la formación del PQS (García-Reyes et al., 2020).

Además de activar la transcripción de los genes necesarios para la síntesis de AQS, el complejo PqsR/PQS o PqsR/HHQ también activa al menos 35 loci adicionales. Sin embargo, en el contexto de la síntesis de piocianina, la relevancia del sistema Pqs recae específicamente en la proteína PqsE (García-Reyes et al., 2021; Letizia et al., 2022).

A diferencia de la síntesis de AQS, se ha observado que en cepas de referencia, como PAO1 y PA14, la delección del gen *pqsE* abate la producción de piocianina, mientras la síntesis de AQS no se ve afectada. Esto último, debido a que otras tioesterasas pueden realizar su función; por tal motivo, se considera a PqsE como un elemento indispensable para la producción de piocianina. Además, se ha reportado que PqsE aumenta el número de genes regulados por RhIR al incrementar la afinidad de RhIR al ADN, así como su concentración en el citoplasma bacteriano, lo que también

demuestra la importancia de PqsE en el funcionamiento de RhIR (Gallagher et al., 2002; García-Reyes et al., 2020, 2021).

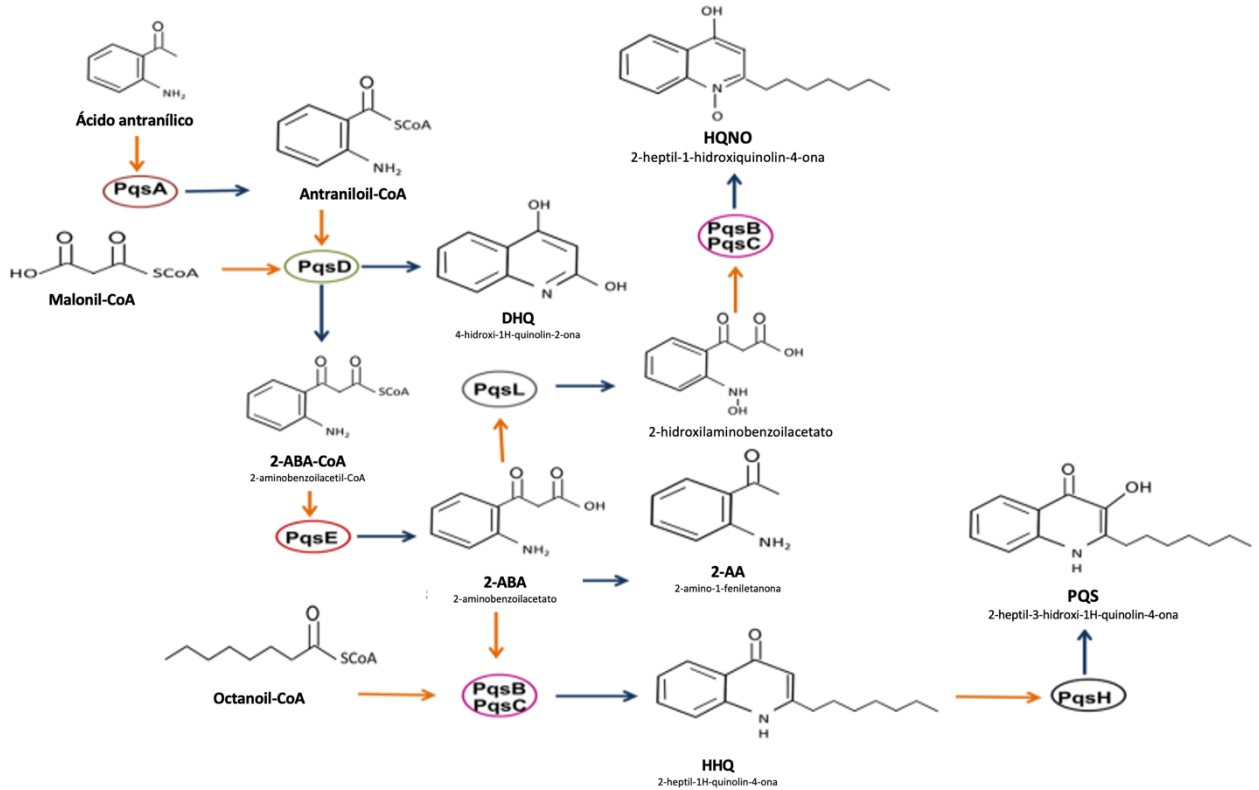


Figura 4. Ruta biosintética de alquil-quinolonas. (Modificado de de Garcia-Reyes, S. 2020)

2.3.3 Sistema Rsm

Otro de los principales mecanismos de regulación de la expresión génica de *P. aeruginosa* es el sistema de regulación global Rsm, cuyo funcionamiento se presenta principalmente después de la transcripción, es decir, a nivel post-transcripcional. Este sistema es homólogo al sistema inicialmente descrito como sistema *Csr* *Escherichia coli*, el cual está implicado principalmente en los mecanismos de almacenamiento de fuentes de carbono, como gluconeogénesis, biosíntesis y catabolismo de glucógeno,

glucólisis, movilidad celular y metabolismo del acetato (Baker et al., 2002). En *P. aeruginosa*, la función del sistema Rsm está relacionado con la producción de metabolitos secundarios. Se compone principalmente de dos proteínas de unión a ARNm, denominadas RsmA y RsmN, las cuales toman su forma activa al formar un homodímero y son reguladas negativamente por cuatro ARN pequeños no codificantes denominados RsmV, RsmW, RsmY y RsmZ. La transcripción de los últimos cuatro ARN pequeños depende de un sistema de dos componentes denominado GacS/GacA (Burrowes et al., 2006; Montelongo-Martínez et al., 2023).

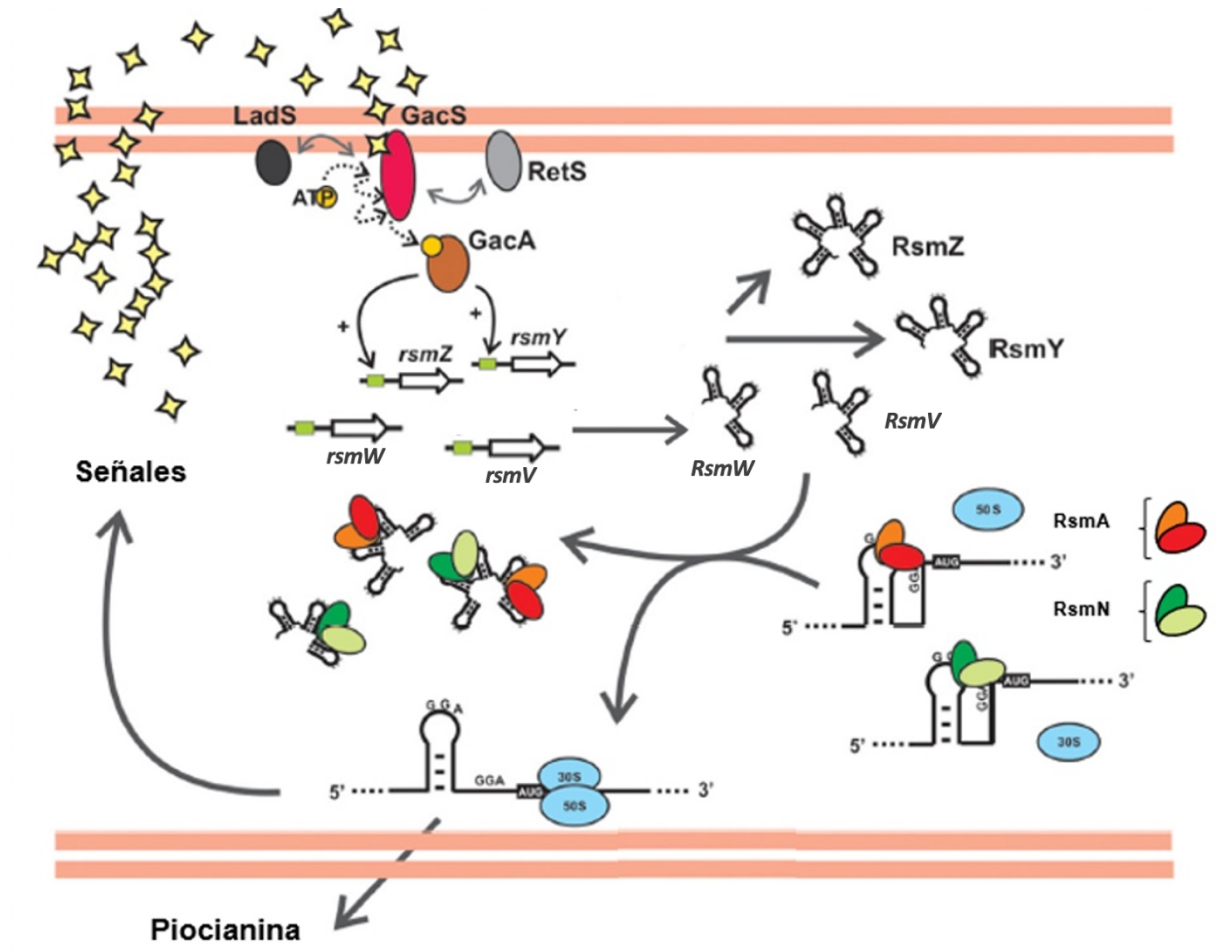


Figura 5. Sistema Rsm de *Pseudomonas aeruginosa* (Modificado de Sobrero y Valverde, 2020)

Como se ilustra en la figura 5 el funcionamiento del sistema Rsm comienza por la unión de la proteína RsmA (o bien RsmN) al ARNm de los genes diana, los cuales presentan el motivo de unión GGA en el 5' UTR que es reconocido por RsmA o RsmN. Generalmente, este motivo se encuentra en el sitio de unión al ribosoma, lo que evita la traducción del ARNm blanco. No obstante, la regulación no siempre es negativa, puesto que en el caso de RsmA, esta también favorece la traducción de algunos ARNm, con la diferencia de que la unión de RsmA genera un cambio en la estructura del ARNm que expone el sitio de unión al ribosoma, favoreciendo así la traducción (Sobrero & Valverde, 2020).

La actividad de RsmA y RsmN es controlada negativamente por los ARN pequeños previamente mencionados, puesto que, al adoptar una estructura secundaria y presentar el motivo de unión GGA cada una de sus asas, RsmA y RsmN pueden acoplarse a ellos, disminuyendo su concentración intracelular libre de estos homodímeros para su unión al ARNm. Ahora bien, la transcripción de estos ARN pequeños está mediada por el sistema de dos componentes GacS/GacA, cuyo funcionamiento depende del reconocimiento de señales externas, aún no descritas, por parte de GacS, además de dos quinasas sensoras de membrana interna adicionales, LadS y RetS, que favorecen o inhiben, respectivamente, la fosforilación de esta proteína. Cuando GacS es fosforilada, permite la fosforilación de GacA, dando lugar a su estado activo como factor de transcripción y favoreciendo la transcripción de los ARN pequeños. En ese sentido, el sistema de dos componentes GacS/GacA es un regulador directo del sistema Rsm (Frangipani et al., 2014; Sobrero & Valverde, 2020; Valverde et al., 2004).

Ahora bien, respecto a la síntesis de piocianina, en cepas de referencia como PAO1 se ha reportado que una mutante con delección en el gen *rsmA* presenta una mayor producción de piocianina. A diferencia de lo anterior, las mutantes en el sistema GacS/GacA disminuyen la producción de este factor de virulencia. Por ende, se considera que el sistema Rsm funge como un regulador negativo en la producción de piocianina (Burrowes et al., 2006; Cocotl-Yañez et al., 2020). RsmA también regula otros factores de virulencia, como la producción de cianuro de hidrógeno (HCN), sistema de secreción de tipo seis (SST6) y la formación de biofilm, que son regulados negativamente, mientras que los ramnolípidos, lipasas y el sistema de secreción de tipo tres (SST3) son regulados positivamente (Nadal Jimenez et al., 2012).

3. Objetivos

3.1 General

Estudiar la regulación de la síntesis de alquil-quinolonas y piocianina por las proteínas RsmA y PqsE en *Pseudomonas aeruginosa* ID4365.

3.2 Particulares

- Determinar el efecto de la mutación del gen *rsmA* sobre la producción de alquil-quinolonas.
- Determinar la regulación de RsmA sobre los genes involucrados en la producción de AQs.
- Determinar la relevancia de la proteína PqsE en la síntesis de piocianina en la cepa ID4365 y en su mutante en *rsmA*.

4. Procedimiento Experimental

4.1 Procedimientos microbiológicos

El cultivo de todas las cepas utilizadas enlistadas en la Tabla 1 se realizó en medio líquido Luria (LB) a una temperatura de 37 °C por 16 h y con agitación orbital. La producción de AQS, actividad enzimática de β -galactosidasa y piocianina se realizaron en medio de proteasa peptona-glucosa-sales de amonio limitado de fosfato (PPGAS) (Zhang & Miller, 1992) a una temperatura de 37 °C por 24 h y con agitación orbital de 225 rpm. Cuando se requirió, el medio LB fue suplementado con los siguientes antibióticos: apramicina (Apra) 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, gentamicina (Gm) 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y carbenicilina (Cb) 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *Escherichia coli*, mientras que para *P. aeruginosa* se utilizaron las concentraciones de Apra 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Gm 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Cb 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y tetraciclina (Tc) 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabla 1. Características de cepas utilizadas.

Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Cepa	Característica	Referencia
PAO1	Aislado clínico de una herida de quemadura aislada en Australia.	Holloway, 1955
PAOrsmA	Cepa PAO1 mutante por delección del gen <i>rsmA</i> sustituido por un casete de resistencia a Tc.	Montelongo, tesis en proceso.
PAOrsmA/pUCrsmA	Cepa PAOrsmA que porta el plásmido pUCrsmA para	Montelongo, tesis en proceso.

	la expresión en trans de <i>rsmA</i> . Resistencia a Cb	
PAOrsmA/pUCP20	Cepa PAOrsmA que porta el plásmido pUCP20. Resistencia a Cb	Montelongo, tesis en proceso.
ID4365	Aislado ambiental del Mar Índico.	Grosso <i>et al.</i> , 2014
IDrsmA	Cepa ID4365 mutante por delección del gen <i>rsmA</i> sustituido por un casete de resistencia a Tc.	Cocotl-Yáñez <i>et al.</i> , 2020
IDrsmA/pUCrsmA	Cepa IDrsmA que porta el plásmido pUCrsmA para la expresión en trans de <i>rsmA</i> . Resistencia a Cb	Cocotl-Yáñez <i>et al.</i> , 2020
IDrsmA/pUCP20	Cepa IDrsmA que porta el plásmido pUCP20. Resistencia a Cb	Cocotl-Yáñez <i>et al.</i> , 2020
ID4365/pLp:pqsA	Cepa ID4365 que porta el plásmido pLp:pqsA. Resistencia a Cb	Este trabajo
ID4365/pLp:phnA	Cepa ID4365 que porta el plásmido pLp:phnA. Resistencia a Cb	Este trabajo
ID4365/pLp:pqsR	Cepa ID4365 que porta el plásmido pLp:pqsR. Resistencia a Cb	Este trabajo
IDrsmA/pLp:pqsA		Este trabajo

	Cepa IDrsmA que porta el plásmido pLp:pqsA. Resistencia a Cb	
IDrsmA/pLp:phnA	Cepa IDrsmA que porta el plásmido pLp:phnA. Resistencia a Cb	Este trabajo
IDrsmA/pLp:pqsR	Cepa IDrsmA que porta el plásmido pLp:pqsR. Resistencia a Cb	Este trabajo
IDpqsE	Mutante por delección del gen <i>pqsE</i> sustituido por un casete de resistencia a Ap.	Este trabajo
IDpqsE/pUCPpqsE	Cepa IDpqsE que porta el plásmido pUCP: <i>pqsE</i> para la expresión en trans de <i>rsmA</i> . Resistencia a Cb	Este trabajo
IDpqsE/pUCP20	Cepa IDpqsE que porta el plásmido pUCP20. Resistencia a Cb	Este trabajo
IDrsmA:pqsE	Mutante por delección de los genes <i>pqsE</i> y <i>rsmA</i> sustituidos por un casete de resistencia a Ap y Tc respectivamente.	Este trabajo
IDrsmA:pqsE/pCB-pqsE	Cepa IDrsmA:pqsE que porta el plásmido pCB-pqsE. Resistencia a Cb	Este trabajo
IDrsmA:pqsE/pUCP20	Cepa IDrsmA:pqsE que porta el plásmido pUCP20. Resistencia a Cb	Este trabajo

PAO1 Δ pqsA -miniCTX:: <i>PpqsA'luxCDABE</i>	CTX:: <i>PpqsA'luxCDABE</i> . Resistencia a Tc.	Diggle <i>et al.</i> , 2011
Cepas de otras especies		
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	ϕ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ [lacZYA- argF]U169 endA recA1 hsdR17 deoRthi-1supE44	Invitrogen

Simplificaciones: Tc: Tetraciclina; Ap: Apramicina; Cb: Carbenicilina

4.2 Manipulación del ADN

Los plásmidos utilizados en este estudio se encuentran enlistados en la Tabla 2. Los plásmidos y el ADN genómico fueron manipulados con técnicas moleculares estándar (Sambrook J & Russell D, 2001). Para la extracción de ADN genómico y plasmídico se utilizaron los kits Thermo Scientific™ Kit de purificación de ADN genómico GeneJET y Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System respectivamente, siguiendo las indicaciones del proveedor en ambos casos. Las ligaciones de ADN de realizaron con T4 DNA ligase (PROMEGA) y las digestiones se realizaron con enzimas de restricción de New England BioLabs. Además, se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando la enzima Phusion Hot Start II (Thermo Scientific) para la amplificación de los insertos a clonar y la enzima GoTaq® Flexi DNA (PROMEGA) para verificación de la presencia de algún fragmento de interés de ADN. Los oligonucleótidos utilizados para las PCR se enlistan en la Tabla 3. Todos lo plásmidos fueron replicados en *E. coli* DH5 α e introducidos a las diferentes cepas *P. aeruginosa* por medio de electroporación.

Tabla 2. Plásmidos utilizados.

Nombre	Característica	Referencia
pLP170	Vector de clonación utilizado para la construcción de fusiones transcripcionales por la presencia del gen reportero <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> . Resistencia a Cb.	Preston et al., 1997
pLP:pqsA	Derivado del plásmido pLP170 que porta la fusión transcripcional <i>pqsA'</i> / <i>lacZ</i> .	Este trabajo
pLP:phnA	Derivado del plásmido pLP170 que porta la fusión transcripcional <i>phnA'</i> / <i>lacZ</i>	Este trabajo
pLP:pqsR	Derivado del plásmido pLP170 que porta la fusión transcripcional <i>pqsR'</i> / <i>lacZ</i>	Este trabajo
pJet1.2/blunt	Vector de clonación	Thermo Scientific
pJetpqsE:Apra	Vector pJet1.2 que porta el fragmento 5'3'pqsE:Apra	Lab. Cocotl-Yañez.
pEx18:Sm	Vector de clonación utilizado para la generación de mutantes por doble recombinación homóloga.	Garcia-Reyes et. al. 2021
pEx:5'3'pqsE:Apra	Vector pEx18Sm que porta el fragmento 5'3'pqsE:Apra extraído del plásmido pJet:5'3'pqsE:Apra	Este trabajo
pUCP20	Vector de expresión con el promotor <i>plac</i> capaz de replicarse en <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i>	West et al., 1994
pUCrsmA		Cocotl et al., 2020

	Vector de expresión pUCP20 con la inserción del gen <i>rsmA</i>	
pCB-pqsE	Vector de expresión pUCP20 con la inserción del gen <i>pqsE</i>	García-Reyes <i>et al.</i> 2021

Simplificaciones: Tc: Tetraciclina; Ap: Apramicina; Cb: Carbenicilina

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados.

Nombre	Secuencia
PpqsA Fw	CGTGAATTCTCATGCTGCCAAAGAATCGC
PpqsA Rv	CCAAAGCTTGCATCCGGATCAGGAGATA
PphnA Fw	GGTGAATTCGACATGGAGGCTTACCTGGA
PphnA Rv	TCAAAGCTTATGGATGTCCCGTCTCAGTC
PpqsR Fw	CACGAATTCTGCGTCATAGTCGCTACACC
PpqsR Rv	TCAAAGCTTCTTCCCTTGATCGGGTCAG
5' pqsE Fw	TAGGATCCAGCGGGTGCTGGTCCTGA
3' pqsE Rv	CCAAGCTTGGATGTCCCGTCTCAGTC
M13 Fw	TGTAACGACGGCCAGT

M13 Rv	CATGGTCATAGCTGTTTCCTG
'LacZ Rv	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACG

4.3 Detección de la producción de alquil-quinolonas

La extracción de los auto inductores y la detección de su producción se realizó de acuerdo con el protocolo reportado por Fletcher et al., 2007. Para ello a partir de pre-cultivos realizados en medio LB, se realizó el inóculo de las cepas ID4365, PAO1 y sus derivadas en el medio de cultivo PPGAS a una D.O._{600nm} de 0.05 y se incubaron en las condiciones previamente mencionadas. Posteriormente los cultivos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante, de los cuales se tomaron 5 mL de cada uno y se transfirieron a tubos de centrifuga de 15 mL, los cuales posteriormente les fue añadido acetato de etilo acidificado y agitados sutilmente por 15 min para realizar una extracción liquido-liquido, recuperándose la fase orgánica de cada uno en tubos de centrifuga de 15 mL. Este procedimiento se realizó una vez más para las mismas muestras de 5 mL de los sobrenadantes. Las fases orgánicas recuperadas se dejaron evaporar hasta obtener remanentes de ~2 mL, los cual fueron transferidos a tubos de microcentrifuga de 2 mL y se dejaron evaporar por completo. Finalmente se realizó la reconstitución de los extractos con 50 µL de metanol.

Para la cuantificación de la producción de AQ se utilizó el biosensor de *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta pqsA$ /CTX $pqsA'$ *luxCDABE* el cual al detectar AQs activa la expresión de la fusión generando luminiscencia. A partir de un pre-inóculo del biosensor en LB de 16 h se llevó a una D.O. _{600nm} de 1 en un volumen de 1 mL para finalmente realizar una

dilución 1:50 en un volumen final de 5 mL. Posteriormente se mezclaron 400 μ L del biosensor (1:50), 380 μ L de medio LB y 20 μ L del correspondiente extracto de AQ, a excepción del control negativo, el cual no lleva extracto de AQ. Finalmente, se depositaron 200 μ L en cada pozo en una placa de 96 pocillos para registrar la luminiscencia y el crecimiento cada 30 min por 18 h utilizando el luminómetro de la marca BioTek® Synergy HT.

4.4 Construcción de fusiones transcripcionales

Las fusiones transcripcionales se realizaron insertando la región promotora de los genes *pqsA*, *phnA* y *pqsR* en el vector pLP170 que porta el gen reportero *lacZ*. Para ello, se amplificaron las regiones reguladoras de los genes mencionados por PCR utilizando como templado ADN genómico de *P. aeruginosa* ID4365 y oligonucleótidos específicos para cada fragmento que contienen los sitios artificiales para EcoR1 en el extremo 5' y HindIII en el extremo 3'. Una vez obtenido se digirieron los fragmentos y se purificaron, además se digirió el vector pLP170 con las mismas enzimas. Posteriormente se realizó la ligación de cada promotor al vector y finalmente cada reacción se usó para transformar a *E. coli* DH5 α . A las candidatas generadas les fue realizado una PCR de colonia y un patrón de restricción con el fin de confirmar que tenían el plásmido esperado. Posteriormente cada plásmido fue secuenciado para verificar que la región clonada estuviera libre de mutaciones.

Una vez construidos los plásmidos, éstos se movilizaron por transformación a las cepas ID4365 e ID*rsmA*. Finalmente, a las candidatas seleccionadas se les realizó una PCR de colonia y se les extrajo el plásmido para realizar un patrón de restricción y confirmar que cada colonia seleccionada tuviese el plásmido esperado.

4.5 Cuantificación de la actividad β -galactosidasa

La determinación de actividad enzimática de β -galactosidasa se realizó de acuerdo con el protocolo reportado por Miller, J. H., 1972. Para ello a partir de pre-cultivos realizados en medio LB, se realizó el inóculo de las cepas de interés en medio de cultivos PPGAS a una $D.O_{600nm}$ de 0.05 y se incubaron en las condiciones previamente mencionadas. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó 1000 μ L de células y se resuspendieron en 1000 μ L de buffer Z para posteriormente realizar la preparación de las reacciones por triplicado de cada muestra con la cantidad de reactivos y tiempos de reacción indicados en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones para cuantificación de actividad β -galactosidasa

Reactivos	
Reactivo	Vol. añadido (μ L)
Buffer Z + β -mercaptoetanol (0.352 %)	800
SDS (0.01 %)	20
CHCl ₃	20
Células	200
Tiempos de Reacción	
Cepa	Tiempo de reacción (min)
ID4365/pLp:pqsA	1:30
ID4365/pLp:phnA	2:30
ID4365/pLp:pqsR	2:30
IDrsmA/pLp:pqsA	1:45
IDrsmA/pLp:phnA	1:30
IDrsmA/pLp:pqsR	2:00

Finalmente se leyó la absorbancia a cada reacción a las longitudes de onda de 420 nm y 520 nm. Además, para determinar el crecimiento, se tomaron 200 μ L de las células resuspendidas en buffer Z y se añade 800 μ L buffer Z a manera de que la relación sea 1:5 de cada muestra y posteriormente se le determinó la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm.

4.6 Generación de las mutantes ID Δ pqsE e IDrsmA Δ pqsE

Inicialmente se realizó la construcción del plásmido pEX:5'3'pqsE-Apra, para ello, por medio de la digestión del plásmido pJet:5'3'pqsE-Apra (previamente construido) con la enzima HindIII se obtuvo el fragmento de interés de 2397 pb, el cual consta de 500 pb río arriba y río abajo del gen *pqsE* que flanquean un casete de resistencia al antibiótico apramicina. Al mismo tiempo, se realizó la digestión del plásmido pEx18Sm con la misma enzima de restricción. Posteriormente ambas digestiones se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1% la cual permitió verificar que estas se llevaron a cabo correctamente, se recuperaron los fragmentos de interés y estos se purificaron utilizando el kit *Wizard® SV Gel an Clean Up System*. Una vez purificados, se ligó el plásmido pEx18Sm y el fragmento 5'3'pqsE-Apra para proceder a la transformación de *E. coli* DH5 α . A las candidatas generadas les fue realizado una PCR de colonia y un patrón de restricción con el fin de confirmar que tenían el plásmido esperado. Se eligió uno de los plásmidos al cual se le secuenció el producto clonado para verificar que estuviera libre de mutaciones y confirmar la clonación correcta.

Una vez construido el plásmido pEx:5'3'pqsE-Apra se llevó a cabo la transformación de *P. aeruginosa* ID4365 e IDrsmA con este plásmido con el fin de que por un evento de doble recombinación homóloga sustituir el gen *pqsE* por el casete de resistencia a apramicina en ambas cepas (Holloway, 1955). Finalmente, a las candidatas generadas se les extrajo DNA genómico y se uso como templado para realizar una PCR con el fin de verificar que estas fuesen mutante al presentar el genotipo mutante, es decir, solo la amplificación de un fragmento de ADN con un tamaño correspondiente al fragmento 5'3'pqsE-Apra.

4.7 Cuantificación de piocianina

La extracción y cuantificación de piocianina se realizó de acuerdo con el protocolo previamente reportado por Essar et al., 1990. Para ello a partir de pre-cultivos realizados en medio LB, se realizó el inóculo de las cepas de interés en medio de cultivos PPGAS a una $D.O_{600nm}$ de 0.05 y se incubaron en las condiciones previamente mencionadas. Después de 24 horas de incubación, los cultivos fueron centrifugados a 10,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se recuperaron los sobrenadantes en tubos cónicos de 50 mL y la pastilla celular fue utilizada para determinar la concentración de proteína, cuyo procedimiento es explicado más adelante. De los sobrenadantes recuperados, se tomaron 5 mL de cada uno y se les agregó 3 mL de cloroformo para realizar una extracción líquido-líquido entre ambas fases. Posteriormente se recuperó la fase orgánica y se colocó en un tubo de ensayo para ser acidificado con HCL 0.2 N. De nuevo se realizó una extracción líquido-líquido recuperando la fase acuosa esta vez, cuya absorbancia fue determinada a una longitud de onda de 540 nm y el valor obtenido se multiplicó por el coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 17.072 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y se dividió entre la proteína total del cultivo. Las extracciones y cuantificaciones se realizaron por duplicado técnico y triplicado biológico, cuando fue necesario, las muestras se diluyeron a razón 1:5.

4.8 Cuantificación de proteína

Para determinar el crecimiento microbiano en los cultivos correspondientes a la producción de piocianina, se cuantificó la proteína total usando la metodología de Bradford, M., 1976. A partir de las pastillas celulares obtenidas en la cuantificación de piocianina se les agregó 4 mL de buffer de lisis y posteriormente las muestras fueron

sonicadas a una amplitud de 40% por 2 minutos en intervalos de 20 segundos. Una vez realizado lo anterior se procedió a la preparación de la curva de calibración con albumina sérica bovina (BSA) y las muestras siguiendo las cantidades de reactivos de la Tabla 5. A cada preparación se le determinó la absorbancia a una longitud de onda de 590 nm y con el siguiente modelo matemático se determinó la cantidad de proteína.

Tabla 5. Reactivos para la cuantificación de proteína.

Curva de calibración		
Reactivo	Vol. Añadido (µL)	Cantidad de proteína (mg)
BSA (1 mg/mL)	2	0.002
	4	0.004
	8	0.008
	16	0.016
	32	0.032
Reactivo de Bradford	200	-
Agua	Lo necesario para volumen final de 1 mL	-
Muestras		
Reactivo	Vol. añadido (µL)	
Lisado	5	
Agua	795	
Reactivo de Bradford	200	

Modelo de matemático utilizado a partir de la regresión lineal de la curva de calibración Abs_{590nm} en función de la cantidad de proteína (mg):

$$Cantidad\ de\ proteína = \frac{Abs_{590nm} - b}{m} * \left(\frac{4000\ \mu L}{5\ \mu L}\right)$$

5. Resultados y Discusión

5.1 RsmA regula la síntesis de alquil-quinolonas en la cepa ID4365

Previamente se reportó cualitativamente que una mutación de pérdida de función en el gen *rsmA* afecta la síntesis de AQs en cepas de referencia como la cepa PAO1 (Burrowes et al., 2006). Por otro lado, a partir de datos obtenidos de un análisis

proteómico, así como un ensayo preliminar en la producción de Aqs en el que su producción se reduce en la mutante IDrsmA, se llegó a la hipótesis de que el sistema Rsm afecta la producción de estos AIs. Con la finalidad de comprobar esta hipótesis, se extrajo los AIs de las cepas PAO1 e ID4365 y sus derivadas mutantes y complementadas y se detectó la presencia de Aqs cuantitativamente utilizando el biosensor PAOpqsA'lux.

Los resultados obtenidos y mostrados en la figura 6 indican que la síntesis de Aqs no se ve afectada en la cepa PAO1 y su mutante en *rsmA* (PAOrsmA). Esto no concuerda con lo previamente reportado por Burrowes et al., 2016. No obstante, la determinación de la producción de Aqs en este trabajo se realizó de forma cualitativa, lo cual podría explicar las diferencias encontradas. Además, en el mismo reporte, por medio de una fusión transcripcional del promotor de *pqsA* a *lacZ*, se observó que la transcripción de *pqsA* no se altera en la mutante en *rsmA*, y se concluyó que la baja producción de PQS es resultado de una disminución de los transcritos de *phnAB* a pesar de que *P. aeruginosa* contiene una sintasa de antranilato adicional que puede suplir la función de *phnAB* para la producción de PQS (Palmer et al., 2013). Por otra parte, en la cepa ID4365, se encontró que la síntesis de Aqs se ve afectada de manera negativa en IDrsmA lo que sugiere que RsmA regula positivamente la síntesis de Aqs en esta cepa. Esto sugiere que en la cepa ID4365 RsmA regula la expresión de genes relevantes del sistema Pqs para la síntesis de Aqs.

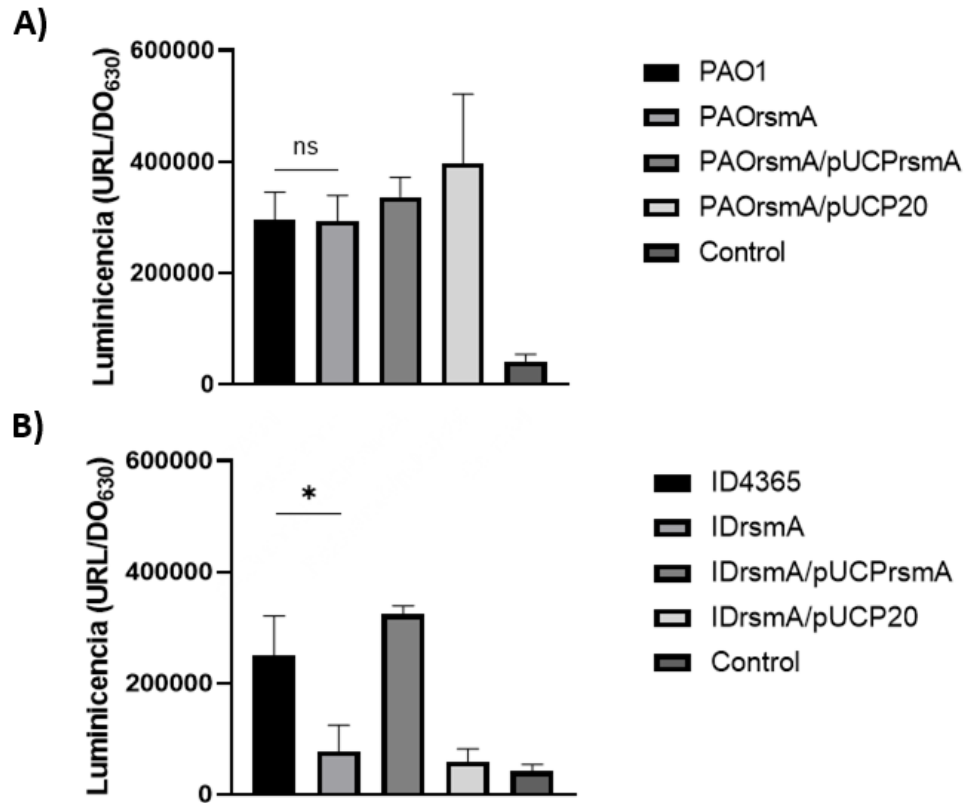


Figura 6. Cuantificación de la producción de AIs de naturaleza alquil-quinolonas bajo la condición silvestre y mutante en *rsmA* de A) ID4365 y B) PAO1. Prueba estadística *t* de student * $p < 0.05$. Control: biosensor PAOpqsA'lux sin autoinductores.

Con el objetivo de determinar cual o cuales son los blancos de regulación de RsmA en esta vía, se construyeron fusiones transcripcionales de los genes involucrados en su síntesis y en su regulación utilizando el vector pLp170 que porta un sitio múltiple de clonación río arriba del gen *lacZ*, usado como gen reportero. En este plásmido se clonaron las regiones promotoras de *pqsA*, *phnA* y *pqsR* con el fin de permitir la expresión de la proteína reportera al insertar las regiones promotoras de los genes en cuestión. Esto posibilita el estudio cuantitativo del nivel de expresión de dichos genes.

Para la realización de las fusiones, inicialmente se amplificó las regiones promotoras de cada gen utilizando los oligonucleótidos correspondientes y a los cuales les fueron añadidos sitios de restricción para EcoRI y HindIII en los extremos 5' y 3' respectivamente, obteniéndose los fragmentos de DNA mostrados en la figura 7.

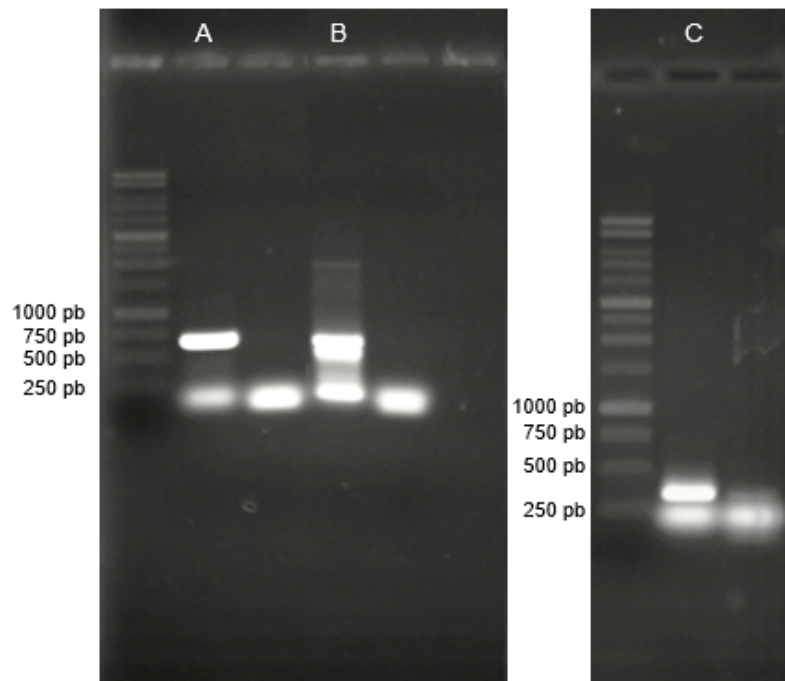


Figura 7. Amplificación por PCR de regiones promotoras de A) *pqsA*, 628 pb; B) *pqsR*, 720 pb; C) *phnA*, 332 pb.

Posteriormente cada fragmento fue digerido con las enzimas de restricción previamente mencionadas para posteriormente ser purificados y ligados al vector pLP170 digerido con las mismas enzimas. Estas ligaciones se usaron para transformar a *E. coli* DH5 α . Obtenidas y seleccionadas las colonias candidatas de cada construcción, se procedió a realizar una PCR de colonia utilizando el oligonucleótido 5' usado para la amplificación de cada región reguladora y un oligonucleótido en

dirección 3' que es específico para una región del gen *lacZ*. Como se observa en la figura 8, los fragmentos amplificados corresponden los tamaños esperados de ~828, 532 y 920 pb para *pqsA*, *phnA* y *pqsR* respectivamente. Cabe aclarar que el tamaño de los amplicones se aumentan 200 pb debido a la amplificación de una fracción del gen *lacZ* del vector de clonación.

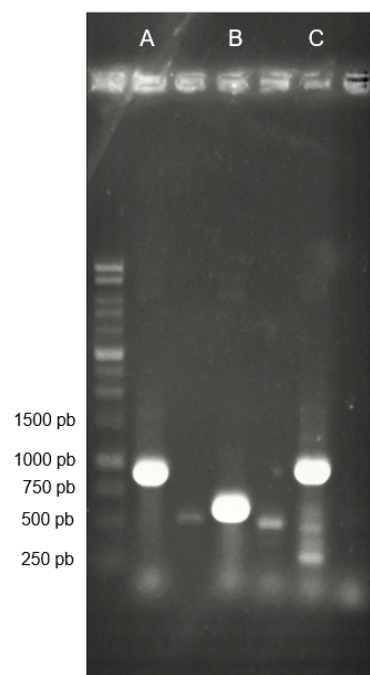


Figura 8. PCR de verificación de la construcción de fusiones transcripcionales de A) *pqsA:lacZ*, 828pb; B) *phnA:lacZ*, 532pb; C) *pqsR:lacZ*, 923pb.

Posteriormente se extrajo el plásmido construido para realizar un ensayo de restricción con la finalidad de verificar la correcta construcción de las fusiones transcripcionales. En la figura 9 se logra observar la liberación de los fragmentos correspondientes a cada región promotora de los genes en cuestión, indicando la correcta construcción de

las fusiones transcripcionales. Finalmente, la región clonada se secuenció para confirmar que estuviera libre de mutaciones.

Estas fusiones fueron introducidas a *P. aeruginosa* ID4365 e IDrsmA por medio de electroporación, para posteriormente seleccionar candidatas resistentes a Cb que indica que tienen el plásmido. A éstas se les realizó una PCR de colonia utilizando los mismos oligonucleótidos mencionados anteriormente con el fin de confirmar la correcta transformación de las cepas.

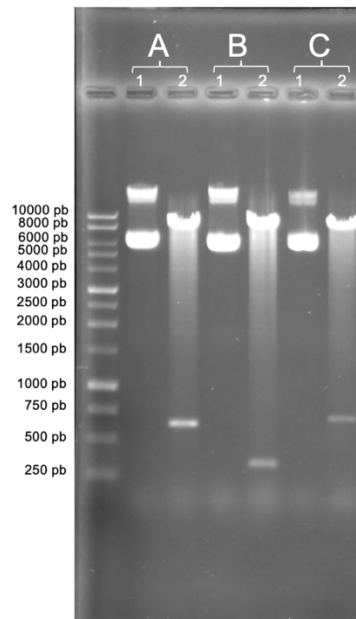


Figura 9. Verificación por restricción de la construcción de fusiones transcripcionales. 1) Sin digerir, 2) Digerido con EcoRI y HindIII. A) *pqsA*, 628 pb; B) *phnA*, 332 pb; C) *pqsR*, 720 pb.

En la Figura 10 observamos una amplificación correspondiente a las fusiones transcripcionales en las candidatas seleccionadas, por lo que se concluye la correcta obtención de las cepas que portan las fusiones transcripcionales de interés.

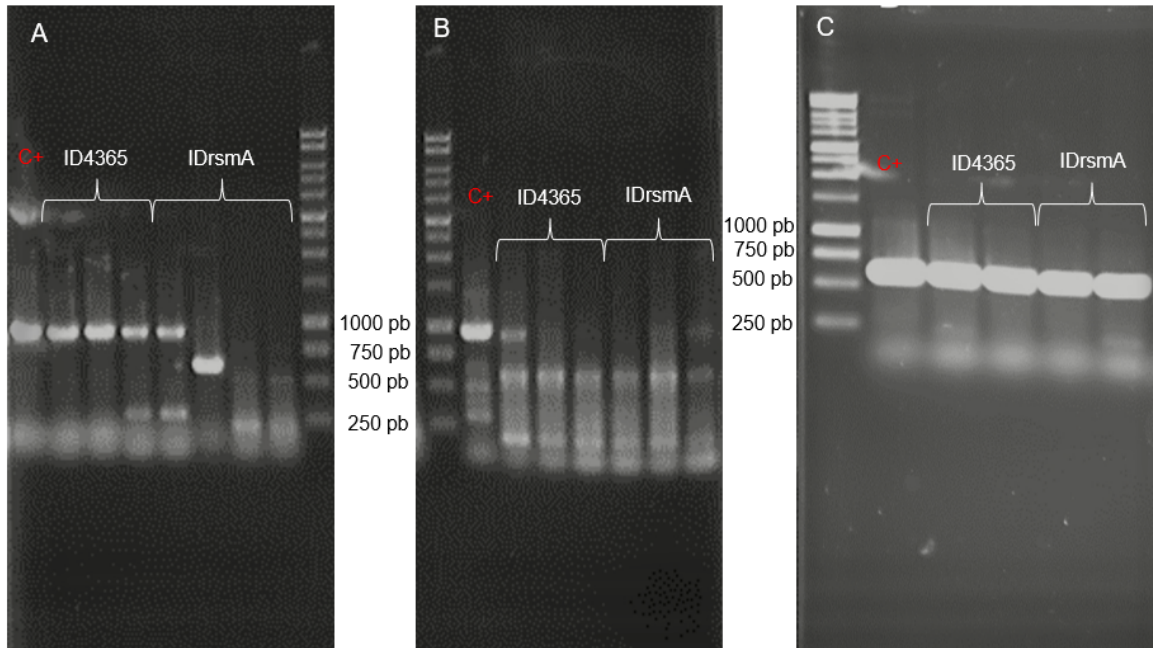


Figura 10. PCR de verificación de candidatas de la transformación de las cepas ID4365 e IDrsmA de *Pseudomonas aeruginosa* con las fusiones transcripcionales. A) pLP:pqsA, 828pb; B) pLP:pqsR, 923pb; C) pLP:phnA, 532pb.

Posteriormente, se cuantificó la actividad transcripcional de los genes *pqsA*, *phnA* y *pqsR* por medio de la actividad enzimática de la β -galactosidasa utilizando orto-nitrofenil- β -galactósido (ONPG) como sustrato. Este compuesto en solución acuosa es incoloro, sin embargo, al ser reconocido por la β -galactosidasa como sustrato, se produce una coloración amarilla resultado de la obtención de orto-nitrofenol como producto de la reacción enzimática, junto con β -D-galactosa. Así, la cuantificación de la producción de orto-nitrofenol puede utilizarse como referencia de la actividad enzimática de la β -galactosidasa y la cual depende de la cantidad de enzima presente que, a su vez, depende del nivel de transcripción de *lacZ* inducida por los promotores

de los genes de interés, por lo que la actividad enzimática de β -galactosidasa es directamente proporcional al nivel de expresión de los genes de interés.

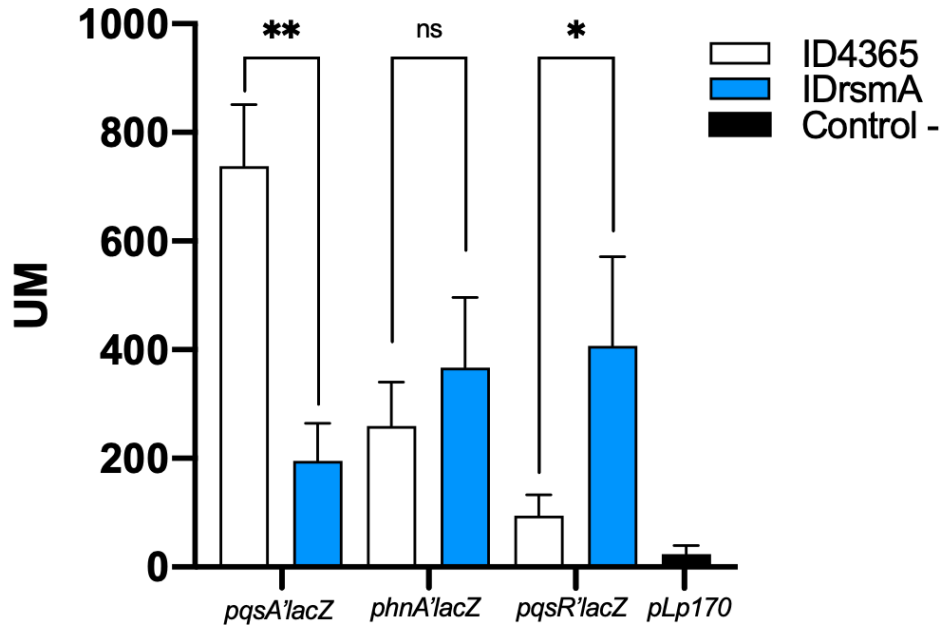


Figura 11. Cuantificación de actividad de β -galactosidasa en ID4365 e IDrsmA. Prueba estadística *t* de student * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, ns=no significativo. Control - : Cepa transformada con el vector pLp170.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 11 como actividad enzimática en Unidades Miller (UM) de las fusiones transcripcionales de *pqsA*, *phnA* y *pqsR* en las cepas ID4365 e IDrsmA. Se observa que la transcripción de *phnA* parece no ser afectada por la mutación de *rsmA*, mientras que la transcripción de *pqsA* se reduce y la de *pqsR* aumenta. Esto indica que RsmA regula la producción de AQ a través de la regulación de la expresión de los genes del sistema Pqs.

Estos resultados concuerdan parcialmente con los resultados de la cuantificación de la producción de Aqs, puesto que una menor transcripción de *pqsA* daría como resultado una menor producción de Aqs en la mutante IDrsmA. No obstante, la disminución de la transcripción de *pqsA* no concuerda con el incremento de *pqsR*, dado que este último es activador transcripcional para *pqsA*, por lo que se esperaría también un incremento en la transcripción de *pqsA*. Sin embargo, el incremento de la transcripción de *pqsR*, se explica debido a que RsmA regula positivamente a RhIR, el cual es un regulador negativo de *pqsR* y por ello al eliminar a *rsmA*, esta represión de RhIR sobre *pqsR* disminuye. Ahora bien, parte de la baja transcripción de *pqsA* puede deberse también a la baja presencia de RhIR. Como se mencionó previamente, RsmA regula positivamente a RhIR, el cual genera un transcrito largo no traducible a partir de *pqsA* y cuyo promotor se encuentra dentro de la región fusionada con *lacZ* del pLP:*pqsA*. En ese sentido, en ausencia de RsmA las concentraciones de RhIR también disminuye, lo que implica una baja transcripción de este transcrito largo y puede verse reflejado en la actividad de β -galactosidasa. Sin embargo, para llegar a una conclusión certera, se necesitaría generar una fusión transcripcional que excluya el motivo de unión de RhIR y evaluar la transcripción de *pqsA* o bien evaluar la traducción del transcrito de *pqsA* y con ello confirmar la baja traducción de *pqsA*. No obstante, los niveles de Aqs se ven reducidos en la mutante IDrsmA, por lo que también es muy probable que la transcripción del ARNm funcional de *pqsA* se vea afectada por la mutación de *rsmA*.

En ese sentido, surge la posibilidad de que el transcrito de *pqsR* sea regulado de forma directa por RsmA positivamente, lo que también explicaría la disminución de la

transcripción de *pqsA*. Cabe recordar que la regulación de RsmA sobre sus genes blanco se realiza principalmente a nivel postranscripcional, ya sea inhibiendo o favoreciendo la traducción de los ARNm a proteína. Siguiendo la hipótesis de que RsmA regula directamente a *pqsR* de forma positiva, en la mutante IDrsmA habría menor traducción de su transcrito a pesar de que la transcripción este aumentada, por lo que este se degradaría y con ello las concentraciones de PqsR se reducirían, lo que conllevaría a una baja en la transcripción de *pqsA*. Para probar esta hipótesis sería necesario evaluar la traducción de *pqsR* en la mutante IDrsmA y la cepa silvestre, en la cual se esperaría una disminución de la traducción en la mutante IDrsmA si la hipótesis fuera correcta. Sin embargo, de no ser así, cabe la posibilidad de que RsmA regule positivamente un elemento, aún desconocido, necesario para la transcripción de *pqsA*.

5.2 PqsE es esencial para la síntesis de piocianina en la cepa ID4365 pero no en la mutante en *rsmA*.

Como ya se ha mencionado previamente, la producción de piocianina está regulada por los sistemas de QS y el sistema Rsm. Sin embargo, con los resultados previos de la regulación de RsmA sobre la síntesis de AQS, surge la pregunta de que tan relevante es la proteína PqsE para la síntesis de piocianina, dado que, como se pudo observar previamente, en la mutante en *rsmA* de la cepa ID4365 (IDrsmA) hay una disminución en la transcripción del gen *pqsA*, lo que sugiere también una disminución de todo operón de *pqsA-E* y con ello también la transcripción de *pqsE*. Sin embargo, bajo esta condición, se ha observado que el fenotipo respecto a la síntesis de piocianina es de una mayor producción de este factor de virulencia en comparación con la cepa

silvestre, lo que sugiere que *pqsE* podría no ser relevante para la síntesis de piocianina. Para comprobar esta hipótesis, se generó una mutación en el gen *pqsE* en la cepa ID4365 e IDrsmA con la finalidad de evaluar si existe algún efecto en la producción de piocianina.

Para generar las mutantes se utilizó un plásmido construido previamente a este trabajo denominado pJet:5'3'pqsE-Apra, al cual se le realizó una digestión con la enzima de restricción HindIII y con ello obtener el inserto 5'3'pqsE-Apra, el cual se ligó al vector de clonación pEX18Sm digerido previamente con HindIII, esta reacción de ligación fue usada para transformar a *E. coli* DH5α para su clonación.

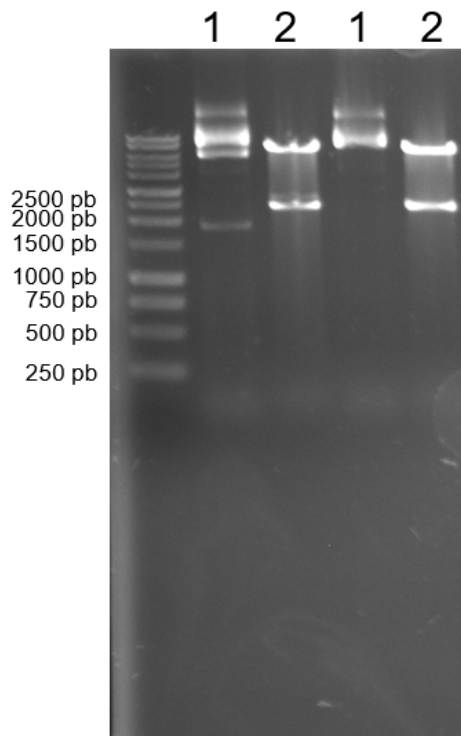


Figura 12. Restricción del plásmido pEX:5'3'pqsE:Apra con la enzima de restricción HindIII.

A las candidatas obtenidas y seleccionadas les fue realizado un patrón de restricción con la enzima HindIII para confirmar la correcta construcción del plásmido pEX: 5'3'*pqsE*-Apra mostrado en la figura 12.

Como se puede observar, en las candidatas probadas hay una liberación de un fragmento de 2400 pb, lo que confirma la liberación del fragmento 5'3'*pqsE*-Apra y con ello la construcción del plásmido. Posteriormente se llevó a cabo la transformación de las cepas ID4365 e ID*rsmA* con el plásmido previamente construido con el fin de generar las mutantes por doble recombinación homóloga, la cual consta de un evento de recombinación en el cual ocurre una sustitución del gen *pqsE* por el casete de resistencia a apramicina tal como se muestra en la figura 13.

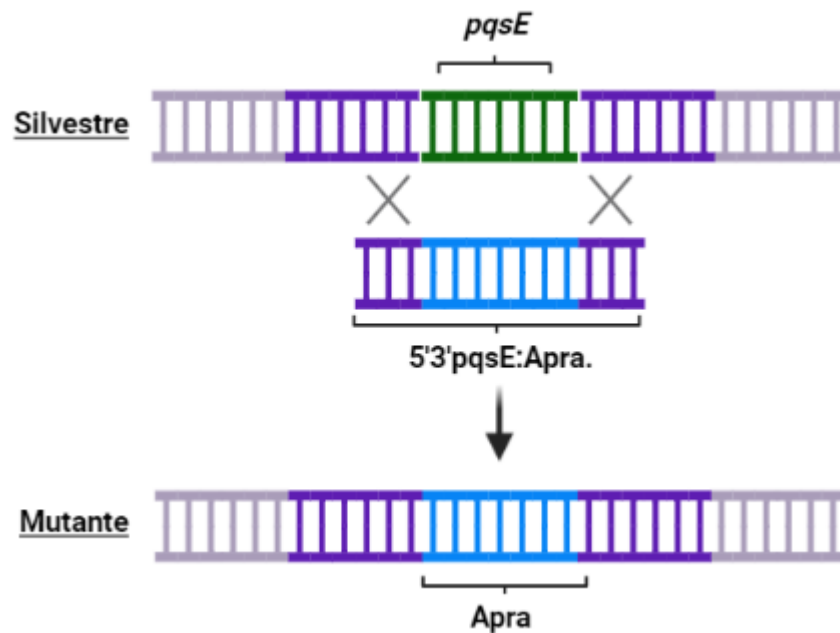


Figura 13. Ejemplificación de la mutación por doble recombinación homóloga

A las candidatas seleccionadas les fue realizada una PCR de colonia en la cual se utilizaron oligonucleótidos que amplifican desde ~500 pb río arriba de *pqsE* hasta ~500 pb río debajo de *pqsE*. Esto permite discriminar si la mutación se llevó a cabo o no al observar la presencia del genotipo silvestre, que consta de la amplificación de las regiones 500 pb río arriba y río abajo del gen *pqsE* además del gen *pqsE*, o el genotipo mutante, que consta igualmente de la amplificación de las regiones 500 pb río arriba y río abajo del gen *pqsE*, pero en lugar de la amplificación del gen *pqsE*, se amplifica el casete de resistencia a apramicina, lo que da fragmentos con un tamaño de 1794 pb y 2397 pb respectivamente.

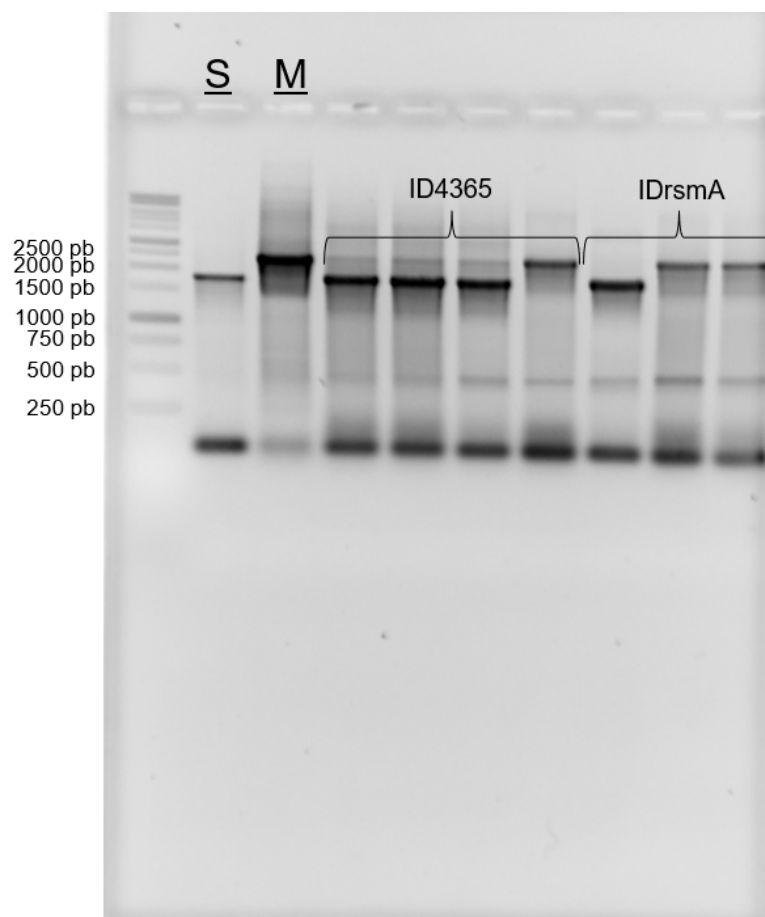


Figura 14. PCR de colonia de las candidatas mutantes. S: Alelo silvestre, M: Alelo mutante.

Como se muestra en la figura 14, solo tres de las colonias presentan la mutación esperada, una correspondiente a la cepa ID4365 y dos correspondiente a IDrsmA, dado que estas presentan una amplificación correspondiente al genotipo mutante. Las demás muestran la amplificación de ambos genotipos, esto se debe a que se llevó a cabo un evento de recombinación homóloga sencilla, la cual conserva el gen *pqsE* y hay una integración del plásmido en el genoma bacteriano, por lo que también presenta el genotipo mutante dando un fenotipo silvestre.

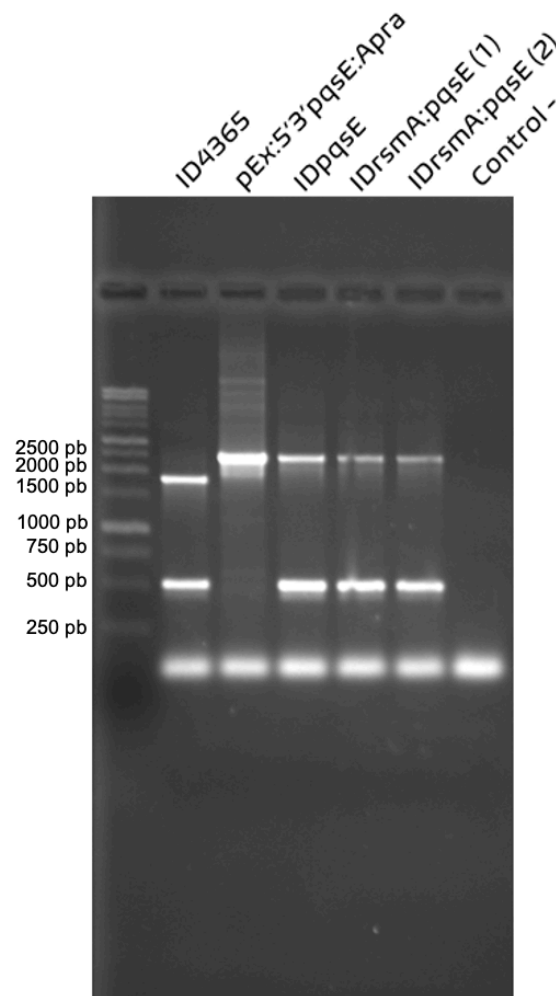


Figura 15. PCR de ADN genómico para la verificación de la generación de mutantes.

Para confirmar que las tres candidatas fueran mutantes, se les extrajo el ADN genómico y se realizó una PCR con los oligonucleótidos previamente utilizados para determinar la presencia de mutantes y utilizado como control positivo el plásmido pEX:5'3'pqsE-Apra. Como podemos observar en la figura 15, las candidatas presentan la amplificación del genotipo mutante, por lo que se concluye que se generaron las mutantes en *pqsE* de la cepa ID4365 e IDrsmA.

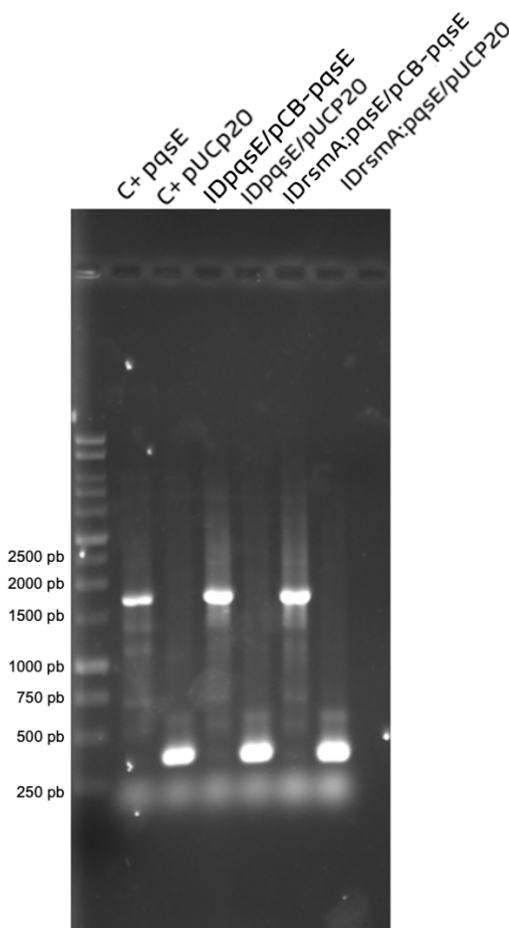


Figura 16. PCR de verificación de la complementación de las mutantes

Finalmente, las mutantes obtenidas fueron complementadas con el alelo silvestre utilizando el plásmido pCB-pqsE (García-Reyes et al., 2021) y el plásmido vacío, pUC20, como control de que el vector de expresión no afecte el fenotipo. Para confirmar que los respectivos plásmidos fueron introducidos a las mutantes, a cada candidata seleccionada les fue realizado una PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos M13Fw y M13Rv, dado que el vector de expresión presenta secuencias para estos y cuya posición flanquea el sitio de clonación múltiple (MCS). Esto permite identificar el tipo de complementación en las candidatas, dado que, el vector de expresión en el cual esté presente el inserto en el MCS del gen *pqsE* mostrará un amplicón mayor, que el vector vacío. Como se observa en la figura 16, los fragmentos amplificados de las candidatas complementadas con el plásmido pUCpqsE y su control positivo muestran el tamaño correspondiente al mismo, mientras que las candidatas complementadas con el vector vacío y su control positivo muestran la amplificación correspondiente al plásmido pUCP20. Con estos resultados, se confirma la complementación de las mutante en *pqsE* de la cepa ID4365 e IDrsmA.

Posteriormente, las cepas fueron cultivadas en el medio de cultivo denominado PPGAS, un medio que favorece la producción de pirocianina al someter a la bacteria en un estado de estrés por su deficiencia de fosfato (Zhang & Miller, 1992), esto permite amplificar el efecto de las mutaciones en el fenotipo. En la figura 17 se muestran los cultivos de las mutantes en *pqsE* de la cepa ID4365 e IDrsmA. De manera cualitativa se observa que en la mutante sencilla en *pqsE* de la cepa ID4365 (IDpqsE) el cultivo presenta un color blanquecino, lo cual al compararse con el cultivo de la cepa silvestre que presenta una coloración verde-azul, indica que la producción de

piocianina pudo abatirse a causa de la mutación. Esto se confirma al observar los cultivos de las complementaciones, en los cuales se aprecia que la mutante IDpqsE complementada con el gen *pqsE* (IDpqsE/pCB-pqsE) se restaura la producción de piocianina al presentar una pigmentación similar a la cepa silvestre, mientras que la mutante IDpqsE complementada con el vector vacío (IDpqsE/pUCP20) mostró la misma pigmentación que la cepa IDpqsE lo que indica que el vector no afecta el fenotipo (figura 17A).

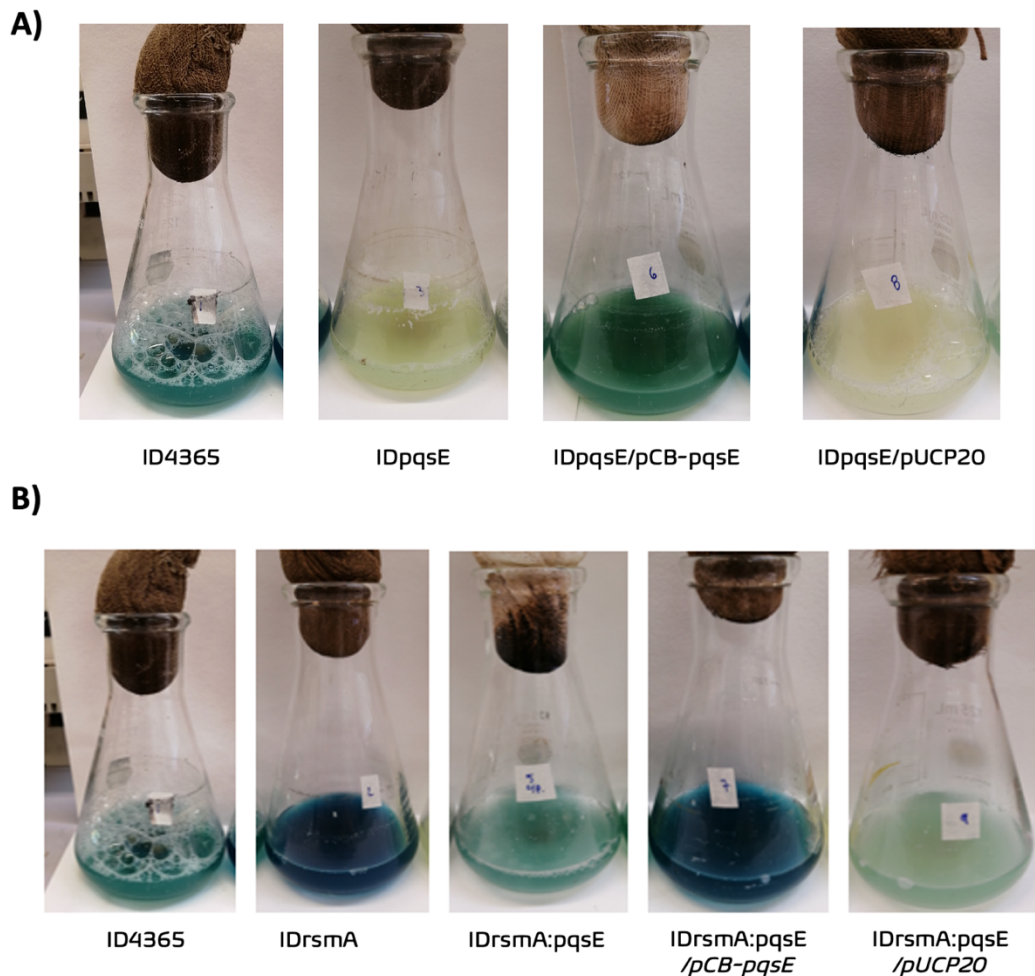


Figura 17. Cultivos en medio PPGAS de A) mutante IDpqsE además de sus complementaciones y B) IDrsmA:pqsE además de sus complementaciones.

Por otra parte, los cultivos correspondientes a la doble mutante IDrsmA:pqsE y sus derivadas mostraron fenotipos diferentes (figura 17B). Como ya se ha mencionado, la cepa IDrsmA produce mayores niveles de piocianina comparados con los de la cepa silvestre, lo cual se observa al mostrar una coloración intensamente azul. Sin embargo, en la doble mutante IDrsmA:pqsE la coloración del cultivo es similar al de la cepa silvestre, lo que indica que la producción de piocianina se ve afectada, pero no abatida como en la cepa IDpqsE. Al complementar la cepa IDrsmA:pqsE con *pqsE* (IDrsmA:pqsE /pCB-pqsE) los niveles de piocianina parecen restaurarse a los de la cepa IDrsmA, al presentarse un color azul intenso en su cultivo, mientras que la complementada con el vector vacío (IDrsmA:pqsE/pUCP20) muestra una coloración en su cultivo azul-verdosa más tenue comparada con la cepa IDrsmA:pqsE. Esto sugiere que en una mutante *rsmA* de ID4365 la inactivación de *pqsE* no abate la producción de piocianina. Sin embargo, debido a que estas conclusiones son basadas en la coloración de los cultivos, se procedió a cuantificar la piocianina producida por estas cepas. Para ello se realizó la extracción de este factor de virulencia a partir de los sobrenadantes de los cultivos realizados en medio PPGAS, así como la cuantificación de la proteína total del cultivo para evaluar el crecimiento celular.

Como se muestra en la figura 18, en la mutante IDpqsE, la producción de piocianina se abate en comparación con la cepa silvestre, y la cual es restaurada a niveles similares a la cepa silvestre al compensar la mutación. Respecto a ello, estos resultados podrían deberse a la regulación de PqsE sobre el factor de transcripción RhIR previamente reportado en diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

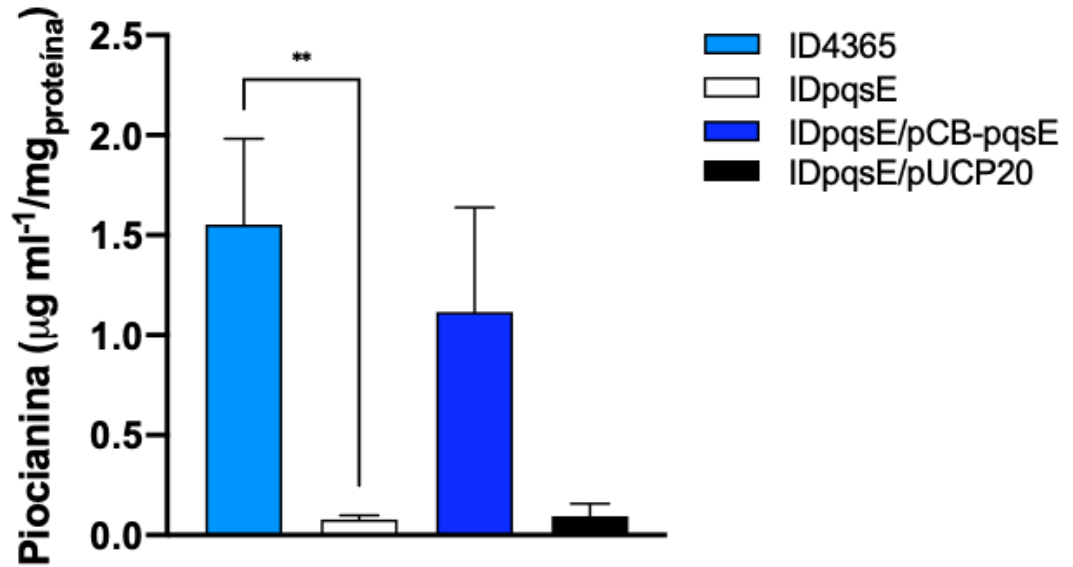


Figura 18. Cuantificación de piocianina en la cepa ID4365, su derivada mutante en *pqsE* y las cepas complementadas. Análisis estadístico *t* de student ** $p < 0.005$.

En la cepa PAO1 previamente se determinó a nivel transcriptómico que PqsE incrementa la expresión de un número considerable de genes dependientes de RhIR (Simanek et al., 2022), mientras que su mutación reduce la expresión de los dos operones *phz* (Higgins et al., 2018). Por otro lado, en la cepa ATCC 9027 de *P. aeruginosa*, se ha observado un aumento en la concentración intracelular de RhIR cuando hay una sobreexpresión de *pqsE* (García-Reyes et al., 2021). Adicionalmente, una interacción proteína-proteína entre PqsE y RhIR se ha descrito en la cepa PA14 dando como resultado una mayor afinidad de RhIR por el ADN de los promotores de sus genes diana, favoreciendo así la transcripción de los mismos (Simanek et al., 2022). Estos efectos de PqsE sobre RhIR podrían estarse presentado en la cepa

ID4365, y dado que entre los blancos regulados positivamente por RhIR se encuentran los dos operones *phzA-G* involucrados en la producción de piocianina, al mutarse a *pqsE*, la expresión de estos podría verse afectado y por lo tanto la producción de piocianina, por lo que, al contrario de lo planteado al inicio del presente estudio, *pqsE* es esencial para la síntesis de piocianina en la cepa ID4365. No obstante, esta hipótesis fue desarrollada a partir de las observaciones fenotípicas previas en la mutante IDrsmA, la cual al realizarle la mutación en *pqsE* muestra un fenotipo distinto comparada con la mutante *pqsE* de la cepa silvestre.

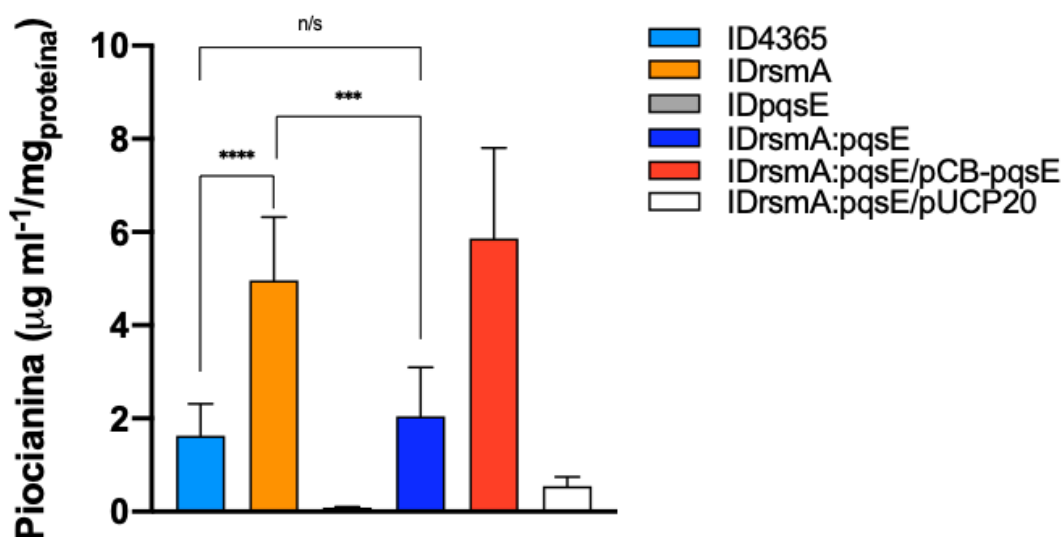


Figura 19. Cuantificación de piocianina en IDrsmA:pqsE. Análisis estadístico *t* de student *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$, ns =no significativo.

Analizando las cuantificaciones de piocianina de la doble mutante IDrsmA/pqsE (figura 19), estas concuerdan con el fenotipo previamente descrito en los cultivos.

Interesantemente la producción de piocianina en la cepa IDrsmA:pqsE se disminuye a niveles muy similares de la cepa silvestre, lo que resulta interesante dado que, mientras que en la mutante IDpqsE se abate la síntesis de piocianina, en esta doble mutante solo se reduce, lo que indica que en una mutante del gen *rsmA* de ID4365, *pqsE* no es esencial para la síntesis de piocianina o bien, la posibilidad de la presencia de un mecanismo independiente de *pqsE* que solo es activo en ausencia de RsmA.

Las observaciones previamente descritas pueden deberse a la regulación de RsmA sobre la expresión de diversos genes directamente a nivel postranscripcional o bien de forma indirecta a nivel transcripcional, dentro de los cuales se incluyen genes implicados en la síntesis de piocianina. Respecto a ello, se ha reportado que en la cepa ambiental M18 de *P. aeruginosa* RsmA regula negativamente la expresión del operón *phzA1-G1* y positivamente la del operón *phzA2-G2* a nivel postranscripcional, sin embargo, el fenotipo resultante es un incremento en la producción de PCA (Ren et al., 2014). En nuestro grupo de trabajo recientemente reportamos que RsmA regula de manera negativa y a nivel post-transcripcional al operon *phz1* y positivamente y a nivel transcripcional al operón *phz2*, los cuales son fundamentales para la síntesis de piocianina. Sin embargo, a pesar de que en la mutante *rsmA* el operón *phz2* se ve afectado, en medio PPGAS, el operón *phz1* es el principal responsable de la síntesis de piocianina, por lo que su producción no se ve afectada. No obstante, la transcripción de los operones *phzA1-G1* y *phzA2-G2* es regulado positivamente por RhIR de forma directa y a su vez este factor de transcripción está regulado positivamente por RsmA, por lo que su mutación disminuye los niveles de RhIR en el citoplasma, con lo que se esperaría una menor expresión de los operones *phz*. Sin

embargo, esto no ocurre, puesto que en la mutante IDrsmA hay expresión del operón *phzA1-G1*, lo que indica que aún con una baja concentración de RhIR por la mutación de *rsmA*, esta es suficiente para activar la transcripción de *phzA1-G* (Montelongo-Martínez et al., 2023). Anteriormente se comentó que PqsE funge como proteína accesoria de RhIR, mejorando así su funcionamiento como factor de transcripción y, por ende, en la mutante IDpqsE, la expresión de los genes implicados en la síntesis de piocianina podría verse afectada, por lo que no hay producción de piocianina. Sin embargo en la doble mutante IDrsmA:pqsE la producción de piocianina solo disminuye a niveles similares a los de la cepa silvestre ID4365, lo que indica que a pesar de las bajas concentraciones de RhIR en el citoplasma y la ausencia de PqsE que favorezca su funcionamiento, la producción de piocianina se mantiene activa. Esto puede deberse a que en la cepa ID4365, RsmA no solo regula negativamente al operón *phzA1-G1*, también regula negativamente la traducción de *phzM* y *phzS*, genes indispensables para la síntesis de piocianina. Mientras que el mecanismo de la regulación indirecta de *phzS* aún no se ha determinado, se ha reportado que *phzM* es regulado a través de RpoS, un factor sigma alterativo que regula negativamente la expresión de *phzM* y por ende la producción de piocianina, y cuya expresión es controlada positivamente por RsmA en la cepa ID4365. En ese sentido, al deletar el gen *rsmA*, la expresión del operón *phzA1-G1*, de *phzM* y *phzS* se ve favorecida, sobrepasando incluso las bajas concentraciones de RhIR en el citoplasma y la ausencia de PqsE. Desde esta perspectiva, se puede concluir que la regulación negativa de RsmA sobre la producción de piocianina es más fuerte que la ausencia de PqsE, por lo que una mutación en *rsmA* suprime la mutación de *pqsE*.

6. Conclusiones

El presente estudio permitió determinar que, en la cepa ID4365 de *P. aeruginosa*:

- RsmA regula positivamente la producción de los autoinductores de naturaleza alquil-quinolonas, mientras que en la cepa de referencia PAO1 esta regulación no se encuentra.
- A nivel transcripcional, la proteína RsmA participa de forma indirecta en la regulación del sistema Pqs, favoreciendo la transcripción del gen *pqsA* y reduciendo la transcripción del gen *pqsR*.
- A diferencia de lo planteado al inicio de este estudio, la proteína PqsE resulta indispensable para la síntesis de piocianina, por lo que al deletar el gen *pqsE*, la síntesis de piocianina se abate.
- RsmA suprime la mutación en *pqsE*, indicando la relevancia de RsmA sobre el control de los genes involucrados en la producción de piocianina.

Estos hallazgos abren nuevas perspectivas como el elucidar por medio de fusiones postranscripcionales la posibilidad de que la proteína RsmA favorezca la traducción de PqsR, explicando así la contrariedad encontrada en los niveles de transcripción de *pqsA* y *pqsR* en la mutante IDrsmA. Además, con la finalidad de entender a mayor profundidad cómo RsmA favorece la producción de piocianina bajo la condición de *pqsE* eliminado, se puede evaluar mediante fusiones transcripcionales y

postranscripcionales la expresión de los dos operones involucrados en la síntesis de piocianina, tanto en la mutante IDpqsE así como en la doble mutante IDrsmA-pqsE.

7. Referencias Bibliográficas

Baker, C. S., Morozov, I., Suzuki, K., Romeo, T., & Babitzke, P. (2002). CsrA regulates glycogen biosynthesis by preventing translation of *glgC* in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 44(6), 1599–1610.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254.

Brouwer, S., Pustelny, C., Ritter, C., Klinkert, B., Narberhaus, F., & Häussler, S. (2014). The PqsR and RhlR transcriptional regulators determine the level of Pseudomonas quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* by producing two different pqsABCDE mRNA Isoforms. *Journal of Bacteriology*, 196(23), 4163–4171.

Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., & O’Gara, F. (2006). Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology*, 152(2), 405–418.

Cocotl-Yañez, M., Soto-Aceves, M. P., 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 Microbiology Letters*, 367(12), 92.

Cox, C. D. (1986). Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infection and Immunity*, 52(1), 263–270.

Das, T., Kutty, S. K., Tavallaie, R., Ibugo, A. I., Panchompoo, J., Sehar, S., Aldous, L., Yeung, A. W. S., Thomas, S. R., Kumar, N., Gooding, J. J., & Manefield, M. (2015). Phenazine virulence factor binding to extracellular DNA is important for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Scientific Reports*, 5.

Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (United Kingdom)*, 166(1), 30–33.

Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A., & Crawford, I. P. (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.

Fletcher, M. P., Diggle, S. P., Cámara, M., & Williams, P. (2007). Biosensor-based assays for PQS, HHQ and related 2-alkyl-4-quinolone quorum sensing signal molecules. *Nature Protocols* 2007 2:5, 2(5), 1254–1262.

Frangipani, E., Visaggio, D., Heeb, S., Kaefer, V., Cámara, M., Visca, P., & Imperi, F. (2014). The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 16(3), 676–688.

Gallagher, L. A., McKnight, S. L., Kuznetsova, M. S., Pesci, E. C., & Manoil, C. (2002). Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 184(23), 6472–6480. <https://doi.org/10.1128/JB.184.23.6472-6480.2002/ASSET/ABE079E9-8B2D-453B->

García-Reyes, S., Cocotl-Yañez, M., Soto-Aceves, M. P., González-Valdez, A., Servín-González, L., & Soberón-Chávez, G. (2021). PqsR-independent quorum-sensing

response of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 outlier-strain reveals new insights on the PqsE effect on RhIR activity. *Molecular Microbiology*, 116(4), 1113–1123.

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

Gonçalves, T., Vasconcelos, U., Pereira, E., Ferreira, I. C. F. R., & Turner, N. D. (2021). Colour Me Blue: The History and the Biotechnological Potential of Pyocyanin. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 927, 26(4), 927.

Grosso-Becerra, M. V., Santos-Medellín, C., González-Valdez, A., Méndez, J. L., Delgado, G., Morales-Espinosa, R., Servín-González, L., Alcaraz, L. D., & Soberón-Chávez, G. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics*, 15(1), 1–14

Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D., & Grant, G. D. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins* 2016, Vol. 8, Page 236, 8(8), 236.

Herrmann, K. M., & Weaver, L. M. (1999). THE SHIKIMATE PATHWAY. In *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* (Vol. 50).

Higgins, S., Heeb, S., Rampioni, G., Fletcher, M. P., Williams, P., & 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(JUL), 252.

Holloway, B. W. (1955). Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of General Microbiology*, 13(3), 572–581.

Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 3128, 22(6), 3128.

Li, T., Huang, X., Yuan, Z., Wang, L., Chen, M., Su, F., Ling, X., & Piao, Z. (2019). Pyocyanin induces NK92 cell apoptosis via mitochondrial damage and elevated intracellular Ca²⁺. *Innate Immunity*, 25(1), 3–12.

Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Delaney, S. M., Soule, M. J., Phillips, G., & 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), 6454–6465.

Miller, J. H. (1972). Assay of b-galactosidase. In *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2003). Quorum Sensing in Bacteria. *Annual review of Microbiology*, 55, 165–199.

Montelongo-Martínez, L. F., Hernández-Méndez, C., Muriel-Millan, L. F., Hernández-Estrada, R., Fabian-Del Olmo, M. J., González-Valdez, A., Soberón-Chávez, G., & Cocotl-Yañez, M. (2023). Unraveling the regulation of pyocyanin synthesis by RsmA

through MvaU and RpoS in *Pseudomonas aeruginosa* ID4365. *Journal of Basic Microbiology*, 63(1), 51–63.

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2013). *Microbiología médica*.

Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1), 46–65.

O'Malley, Y. Q., Reszka, K. J., Spitz, D. R., Denning, G. M., & Britigan, B. E. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 287(1 31-1), 94–103.

Palmer, G. C., Jorth, P. A., & Whiteley, M. (2013). The role of two *Pseudomonas aeruginosa* anthranilate synthases in tryptophan and quorum signal production. *Microbiology (United Kingdom)*, 159(PART 5), 959–969.

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J., & Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, 37(1), 177–192.

Preston, M. J., Seed, P. C., Toder, D. S., Iglewski, B. H., Ohman, D. E., Gustin, J. K., Goldberg, J. B., & 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.

- Ren, B., Shen, H., Lu, Z. J., Liu, H., & Xu, Y. (2014). The *phzA2-G2* transcript exhibits direct RsmA-mediated activation in *Pseudomonas aeruginosa* M18. *PLoS ONE*, *9*(2).
- Sambrook J, & Russell D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.).
- Schuster, M., & Greenberg, E. P. (2006). A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*, *296*(2–3), 73–81.
- Serino, L., Reimann, C., Visca, P., Beyeler, M., Chiesa, V. Della, & Haas, D. (1997). Biosynthesis of pyochelin and dihydroaeruginic acid requires the iron-regulated *pchDCBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *179*(1), 248–257.
- Simanek, K. A., Taylor, I. R., Richael, E. K., Lasek-Nesselquist, E., Bassler, B. L., & Paczkowski, J. E. (2022). The PqsE-RhIR Interaction Regulates RhIR DNA Binding to Control Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology Spectrum*, *10*(1).
- Smith, R. S., & Iglewski, B. H. (2003). *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Current Opinion in Microbiology*, *6*(1), 56–60.
- Sobrero, P. M., & Valverde, C. (2020). Comparative Genomics and Evolutionary Analysis of RNA-Binding Proteins of the CsrA Family in the Genus *Pseudomonas*. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*, 127.
- Sporer, A. J., Beierschmitt, C., Bendebury, A., Zink, K. E., Price-Whelan, A., Buzzeo, M. C., Sanchez, L. M., & Dietrich, L. E. P. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* PumA

acts on an endogenous phenazine to promote self-resistance. *Microbiology (United Kingdom)*, 164(5), 790–800.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalk, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964.

Valverde, C., Lindell, M., Wagner, E. G. H., & Haas, D. (2004). A Repeated GGA Motif Is Critical for the Activity and Stability of the Riboregulator RsmY of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25066–25074.

Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319–346.

Whiteley, M., & Greenberg, E. P. (2001). Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *Journal of Bacteriology*, 183(19), 5529–5534.

Zhang, Y., & Miller, R. M. (1992). Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10), 3276–3282.