



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Regulación de la expresión del sistema de secreción tipo III (SST3) por la respuesta de *quorum sensing* en *Pseudomonas aeruginosa*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Luis Fernando Montelongo Martínez

TUTOR PRINCIPAL:

D. en C. Miguel Cocotl Yañez
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

D. en C. Bertha María Josefina González Pedrajo
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

D. en C. Víctor Humberto Bustamante Santillán
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Ciudad de México. Diciembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Sinodales asignados para la réplica oral.

Presidente: D. en C. Puente García José Luis

Vocal: D. en C. Camarena Mejía Rosa Laura

Vocal: D. en C. Núñez López Cinthia Ernestina

Vocal: D. en C. García Contreras Rodolfo

Secretario: D. en C. Georgellis Dimitris

Tutor principal: D. en C. Cocotl Yañez Miguel

Este proyecto fue dirigido por el D. en C. Miguel Cocotl Yañez y realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina. Parte del proyecto fue realizado con el grupo de trabajo de la D. en C. Gloria Soberón Chávez en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. De igual manera, parte fundamental del trabajo fue realizado con el grupo de trabajo de la D. en C. Bertha González Pedrajo en el Departamento Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante el desarrollo del presente proyecto, el sustentante Luis Fernando Montelongo Martínez, fue becado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con No. CVU: 927093. De igual manera, recibió apoyo por parte del Programa de Apoyo de Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir al VI Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias y XLI Congreso Nacional de Microbiología, Oaxaca, 2019.

Este trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) como parte del proyecto IA203519.

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado,
un esfuerzo total es una victoria completa”

Gandhi

Agradecimientos:

A nuestra fuerza creadora.

A Novia Minerva, por siempre ser mi fuerza espiritual.

A mi Madre, por ser un ejemplo de inteligencia, paciencia, virtud y amor infinito.

A mi Padre, por sus consejos y experiencia.

A mis hermanos, por su paciencia, risas y apoyo incondicional.

Al D. en C. Miguel Cocotl Yañez, por qué antes que nada es un gran ser humano que siempre se mostró comprometido, cabal y disponible para apoyarme en lo académico y lo personal.

A la D. en C. Gloria Soberón Chávez, por aceptarme como parte de su equipo de trabajo, y de quién siempre recibí valiosos comentarios y críticas positivas que hicieron posible este trabajo.

A la futura D. en C. Abigail González Valdez, por su confianza y enseñanzas.

A los integrantes del laboratorio, por su apoyo en la realización de este trabajo.

A los integrantes de mi comité tutorial, quienes me permitieron una nueva perspectiva y me guiaron durante este proyecto.

A los integrantes del equipo de trabajo de la D. en C. Bertha González Pedrajo, quienes me facilitaron la realización de experimentos fundamentales para este proyecto.

A los sinodales, por su acuciosa crítica y revisión del escrito.

A la comunidad científica y a mi *alma mater*, la UNAM, que con su trabajo hacen de México un mejor país.

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una gamma-proteobacteria ambiental de importancia médica. Este patógeno oportunista es capaz de infectar seres humanos, causando infecciones de difícil erradicación y que representan altos índices de mortalidad a nivel mundial. La virulencia de la bacteria es multifactorial, pero involucra la secreción de diversos factores de virulencia cuya producción es controlada a nivel transcripcional por los sistemas de percepción de quórum o *quorum sensing* (QS). *P. aeruginosa* posee tres sistemas de QS, llamados Las, Rhl y Pqs, los cuales se activan de manera proporcional al incremento en la densidad celular y se organizan en una cascada de regulación, con el sistema Las en la cima.

Después de la activación del sistema Rhl, el regulador transcripcional RhIR se une al autoinductor N-butilil-homoserina lactona (C₄), que es sintetizado por la enzima RhII, para controlar la expresión de genes importantes para la virulencia de la bacteria, entre ellos el sistema de secreción tipo III (SST3). Este último permite la inyección de exotoxinas directamente en el citoplasma de la célula huésped, para inhibir la respuesta inmune y favorecer la sobrevivencia de la bacteria.

Debido a que el efecto que ejercen los sistemas de QS sobre la expresión del SST3 no es claro, en el presente trabajo nos enfocamos en describirlo. Mediante fusiones transcripcionales de genes representativos del SST3 con el reportero *lux* y ensayos de producción de exotoxinas, demostramos que en condiciones de inducción el regulador RhIR regula positivamente la expresión del operón *exsCEBA*, a partir del cual se transcribe *exsA* como último elemento; el cual se traduce a la proteína reguladora ExsA para formar un circuito de auto-regulación positiva, que tiene como consecuencia la activación de todos los elementos del SST3. En este sentido, la inactivación de *rhIR* abate la expresión de genes del SST3 y la producción de las exotoxinas S y T; mientras que LasR parece tener un efecto post-transcripcional negativo. Lo anterior demuestra la versatilidad de los sistemas de QS para controlar la actividad del SST3, un determinante crítico para la virulencia de *P. aeruginosa*.

ÍNDICE

RESUMEN	6
CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN	10
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.2. Sistemas de percepción de quórum (<i>Quorum Sensing</i>).....	11
1.2.1. Sistema Las	14
1.2.2. Sistema Rhl	14
1.2.3. Sistema Pqs.....	16
1.3. Organización jerárquica de los sistemas de QS.....	17
1.4. Máquinas de secreción bacteriana.....	19
1.5. Sistema de secreción tipo III (SST3) de <i>P. aeruginosa</i>	19
1.5.1. Estructura del SST3.....	23
1.5.1.1. Cuerpo basal	25
1.5.1.2. Aparato exportador	25
1.5.1.3. Complejo clasificador.....	25
1.5.1.4. Filamento o aguja	25
1.5.1.5. Translocadores	26
1.5.1.6. Proteínas que regulan la jerarquía de secreción	26
1.5.1.7. Efectores	26
1.6. Regulación transcripcional del SST3.....	29
1.6.1. Regulación intrínseca	29
1.6.1.1. Regulador maestro del SST3	29
1.6.1.2. Cascada ExsCEDA.....	31
1.6.2. Regulación extrínseca del SST3.....	33
1.6.2.1 Control de la actividad desde el promotor P_{exsC}	33
1.6.2.2. Control de la actividad desde el promotor interno P_{exsA}	33
1.7. Control post-transcripcional de ExsA	34
CAPÍTULO II.- ANTECEDENTES.....	36

CAPÍTULO III.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	38
3.1. Hipótesis:.....	38
3.2. Objetivo general:	38
3.2.1. Objetivos particulares:	38
CAPÍTULO IV.- MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo.....	39
4.2. Técnicas de manipulación del ADN.....	39
4.3. Construcción de fusiones transcripcionales	40
4.4. Ensayos de luminiscencia	41
4.5. Análisis estadístico	41
4.6. Ensayos de producción de efectores por el SST3.....	42
4.7. Construcción del plásmido pExsA (<i>exsA⁺⁺⁺</i>).....	43
4.8. Generación de mutantes por delección.....	43
4.9. Extracción de autoinductores	44
4.10. Ensayo para cuantificar la producción de C ₁₂	44
CAPÍTULO V.- RESULTADOS	46
5.1. Evaluación del sistema de expresión	46
5.1.1 Construcción de fusiones transcripcionales pC-lux y pP-lux.....	46
5.1.2. Comprobación de la integración cromosomal de las fusiones	47
5.1.3. Cuantificación de la actividad de las fusiones en inducción.....	48
5.2. Efecto del sistema Rhl en la expresión del SST3.....	50
5.2.1. Efecto de la inactivación del gen <i>rhIR</i> en la expresión de genes del SST3 durante la fase logarítmica tardía	50
5.2.2. Efecto de la sobre-expresión de ExsA en la cepa $\Delta rhIR$	51
5.2.3. Efecto de la inactivación de <i>rhIR</i> y la sobre-expresión de ExsA en la producción de exotoxinas.	53
5.2.4. Efecto de la inactivación de <i>rhIR</i> y la sobre-expresión de <i>exsA</i> en la expresión de genes del SST3 durante la fase estacionaria	55

5.2.5. Efecto de la inactivación de los genes <i>rhII</i> y <i>pqsE</i> en la producción de exotoxinas.....	57
5.3. Efecto de sistema Las sobre el SST3	59
5.3.1. Efecto de la inactivación de <i>lasR</i> en la actividad <i>exsCEBA</i> y <i>exoS</i>	59
5.3.2. Efecto de LasR en la producción de exotoxinas	62
5.4. Efecto la doble inactivación de los genes <i>lasR</i> y <i>rhIR</i> sobre la actividad de genes representativos del SST3	64
5.4.1. Efecto de la doble mutante $\Delta lasR$ -Ap / $\Delta rhIR$ sobre la expresión de las fusiones y la producción de exotoxinas	64
5.4.2. Diferencias entre las cepas dobles mutantes sobre la producción de exotoxinas.....	67
CAPÍTULO VI. - DISCUSIÓN.....	70
6.1. Efecto del sistema Rhl en la actividad del SST3	70
6.2. Efecto del sistema Las en la actividad del SST3.....	75
6.3. Efecto de la doble mutante $\Delta lasR$ -Ap / $\Delta rhIR$ en la actividad del SST3.....	78
CAPITULO VII. – CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	81
MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	82
Lista de tablas:.....	82
Lista de figuras:	83
REFERENCIAS.....	94

CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN

La percepción de señales químicas, físicas y/o metabólicas, permite que las bacterias se adapten a diversos microambientes. A pesar de que algunas de estas señales son desconocidas, se han logrado describir los mecanismos involucrados en el control de los genes que son necesarios para la adaptación bacteriana [1].

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

El género *Pseudomonas* está compuesto por más de 140 especies. Son γ -proteobacterias, ubicuas y se clasifican como bacilos Gram negativos. Su amplia versatilidad metabólica le permite adaptarse a cualquier microambiente y habitar una amplia variedad de entornos incluyendo tierra y agua [2]. *Pseudomonas aeruginosa* es la especie de mayor importancia médica por su capacidad de infectar seres humanos. Es un patógeno oportunista que ha sido aislado de infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística, inmunocomprometidos, quemaduras e infecciones urinarias y oculares, entre otras. De igual manera ha sido aislado de dispositivos médicos inanimados como catéteres, equipos de diálisis y respiradores [3]. Es naturalmente resistente a diversos antibióticos y ha adquirido plásmidos que favorecen su resistencia a los principales antibióticos utilizados para el tratamiento de estas infecciones. Se ha reportado que al menos el 13% de las infecciones son causadas por cepas multidrogo resistentes (MDR), las cuales frecuentemente son aisladas de pacientes con fibrosis quística en EUA y Europa. Esto representa un problema de salud debido a los índices de morbilidad y mortalidad que presentan estas infecciones [4].

La cepa de referencia PAO1 posee un genoma de 6.3 Mpb, que codifica para aproximadamente 5567 marcos de lectura abiertos. Se estima que al menos el 9% de su genoma son genes que codifican para proteínas con capacidad reguladora, algunos de las cuales están involucradas en controlar el crecimiento, mecanismos de resistencia antimicrobiana y virulencia. El potencial regulatorio de *P. aeruginosa*

podría explicar su versatilidad metabólica, lo que indica que tiene un amplio repertorio de genes que favorecen su capacidad de adaptación y resiliencia [5].

Además de poseer flagelo y adhesinas, que favorecen su movilidad y agregación respectivamente, *P. aeruginosa* es capaz de producir y secretar un amplio repertorio de factores de virulencia como: exoproteasas, fosfolipasas, cianuro de hidrógeno (HCN), exolisina A, piocianina, ramnolípidos, exopolisacaridos para la formación de biopelículas, entre otros. Algunos de estos factores de virulencia son regulados a nivel transcripcional por los sistemas de percepción de quórum o *quorum sensing* (QS) que posee la bacteria. El control de la producción de estos factores de virulencia ha desencadenado la posibilidad de desarrollar componentes anti-QS que permitan reducir su virulencia, y con ello disminuir el uso de antibióticos que favorezcan la selección positiva de cepas multirresistentes [6, 7].

1.2. Sistemas de percepción de quórum (*Quorum Sensing*)

Para adaptarse en diversos microambientes, las bacterias han desarrollado un lenguaje químico dependiente de la densidad celular que le permite monitorear los cambios extracelulares. De manera directamente proporcional a la densidad celular, se producen y secretan moléculas de bajo peso molecular, conocidas como auto-inductores (AIs). En bacterias Gram negativas los AIs son moléculas orgánicas conocidas como acil homoserina lactonas (AHLs), las cuales son sintetizadas por enzimas de la familia LuxI a partir de S-adenosil-metionina (SAM) y cadenas de ácidos grasos. Las AHLs se forman por un anillo de lactona unido a una cadena orgánica de carbonos con grupos acilo de diferente longitud, donde el sustituyente del carbono 3 puede ser variable. Estos AIs se producen de manera proporcional a la densidad celular, de tal manera que cuando alcanzan una alta concentración extracelular —lo cual es un reflejo del incremento del crecimiento celular— los AIs re-ingresan al citoplasma bacteriano para unirse a reguladores transcripcionales (RT). La formación del complejo RT-AI favorece que el RT exponga sus dominios de unión al ADN para controlar la transcripción de genes específicos. La regulación

génica por la respuesta de QS permite coordinar una respuesta colectiva, que favorece su adaptación y virulencia [8].

Este tipo de comunicación química inicialmente se describió al evaluar la relación mutualista entre la bacteria marina *Aliivibrio fischeri* y la sepiólida *Euprymna scolopes*. La bacteria posee genes de bioluminiscencia coordinados por un sistema de QS, su activación brinda un fenómeno de contra-iluminación a *E. scolopes* en aguas poco profundas para evitar la depredación y sobrevivir. Su estudio permitió identificar los genes *luxI* y *luxR*, los cuales codifican para la sintasa del autoinductor N-3-oxo-hexanoil-homoserina-lactona (C₆) y para el regulador transcripcional cognado, respectivamente. La unión del complejo LuxR-C₆ activa la transcripción del gen *luxI* —lo que incrementa la producción del AI— y del operón *luxCDABE*, el cual codifica para la luciferasa una enzima capaz de producir luz (Figura 1). Posteriormente, se identificaron genes homólogos a *luxI/luxR* en *P. aeruginosa* y otras bacterias, resaltando la importancia de los sistemas QS para el control de la expresión génica [9].

P. aeruginosa es un modelo para el estudio de los sistemas de QS. Esta bacteria posee tres sistemas, dos de ellos son homólogos del sistema Lux, conocidos como Las y Rhl. Adicionalmente, posee un tercer sistema llamado Pqs en donde el regulador transcripcional pertenece a la familia LysR y los AIs son moléculas de naturaleza alquil-quinolona (AQ). Estos sistemas están organizados de manera jerárquica, con el sistema Las en la cima de la cascada regulatoria. Los sistemas Las y Rhl controlan la expresión —directa e indirecta— de 300 a 600 genes, lo cual corresponde del 6 al 10 % del genoma de la cepa PAO1 [10]. Análisis de transcriptomas han demostrado que los sistemas de QS controlan genes que codifican para reguladores transcripcionales y post-transcripcionales, genes metabolismo central del carbono y ácidos grasos; así como genes de virulencia, lo que demuestra la importancia de los sistemas de QS para la fisiología y virulencia de la bacteria [11, 12].

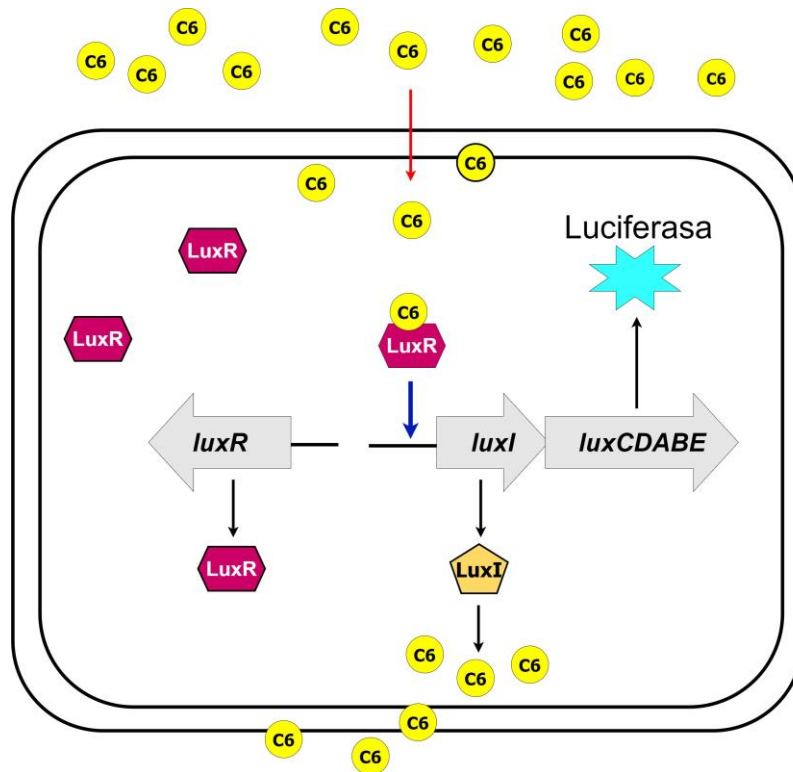


Figura 1. Comunicación celular por *quorum sensing* (QS). La concentración del autoinductor (C_6), sintetizado por la sintasa (LuxI), aumenta de manera proporcional a la densidad celular y difunde libremente por las membranas bacterianas. Al alcanzar una concentración crítica, el C_6 reingresa al citoplasma bacteriano y se acopla al regulador transcripcional (LuxR) para formar el complejo LuxR- C_6 , que se une al ADN para activar la transcripción de los genes *luxCDABE*, los cuales producen la enzima luciferasa. [Modificado de referencia 9].

1.2.1. Sistema Las

En 1991, los estudios realizados en la cepa *P. aeruginosa* PA103 —una bacteria incapaz de producir elastasa a pesar de tener el gene *lasB* intacto— permitieron el descubrimiento del regulador transcripcional LasR y la posterior descripción del sistema [13]. El sistema Las está integrado por LasR y su autoinductor N-3-oxo-dodecanoil-L-homoserina lactona (3-O-C₁₂-HSL o C₁₂), que es sintetizado por la enzima LasI. La formación del complejo LasR-C₁₂ reconoce una secuencia consenso de ADN, conocido como *las-box* en la región promotora de los genes que regula. Además, el sistema Las se auto-regula de manera positiva al favorecer la expresión de los genes *lasR* y *lasI*. Sin embargo, para controlar los niveles del complejo LasR-C₁₂, el mismo sistema activa la transcripción del gen *rsaL* que codifica la proteína RsaL. Este último es un represor del sistema Las y se une al promotor bi-direccional *rsaI-lasI* para bloquear su expresión, formando un circuito de autorregulación negativa. El regulón del sistema Las comprende al menos 300 genes, algunos de los cuales están involucrados en la producción de exoproteasas, HCN y exotoxina A. Adicionalmente, activa la expresión de los genes *rhII* y *rhIR* (que forman parte del sistema Rhl) y los genes *pqsR* y *pqsH* (que forman parte del sistema Pqs) [14, 15].

1.2.2. Sistema Rhl

En 1995 se describió al segundo sistema de regulación de QS, conocido como Rhl. Este sistema se compone del regulador transcripcional RhIR y la enzima RhII, responsable de sintetizar N-butil-L-homoserina lactona (C₄-HSL o C₄). La formación del complejo RhIR-C₄ regula directamente la transcripción de los genes *rhIA*, *rhIB*, cuyos productos son enzimas responsables de la síntesis de ramnolípidos. Además, el regulón del sistema Rhl incluye genes involucrados en la producción de piocianina, lectinas, HCN y elastasa [15].

La regulación del sistema Rhl es compleja, el regulador Vfr reprime la expresión de *rhIR*, lo cual se contrarresta por la unión del complejo LasR-C₁₂ en la región

promotora de los genes *rhIR* y *rhII*, de esta manera, conforme aumenta la activación del sistema Las también incrementa la expresión del sistema Rhl. Una vez activo el sistema Rhl, se genera un circuito de autorregulación positiva mediante la unión del complejo RhIR-C₄ al promotor de *rhIA*, lo cual permite la expresión de un ARNm policistrónico que comprende los genes *rhIABRI* [16, 17]. Sin embargo, se ha observado que en cepas aisladas de infecciones crónicas de pacientes con fibrosis quística —las cuales tienen inactivo al sistema Las— el sistema Rhl está activo, por lo cual se ha propuesto una activación del sistema Rhl que es independiente del sistema Las [18]. Respecto a lo anterior, se ha observado que en modelos de evolución prolongada se generan cepas con un LasR inactivo, por lo cual se reconfigura la jerarquía de activación de los sistemas de QS (sistema de QS atípico); para lo cual se ha sugerido que se debe a mutaciones en el regulador MexT en la cepa PAO1 [19] o por el incremento en la expresión de *rhII* en la cepa PAE90, un aislado clínico [20].

A diferencia del sistema Las, el regulador RhIR puede dimerizar sin la unión de C₄, por lo cual se ha propuesto que RhIR puede tener una actividad dual sobre la transcripción de los genes *rhIA* y *rhIB*; de tal manera que cuando RhIR se une sin C₄ reprime la transcripción, pero se activa por la unión del complejo con RhIR-C₄ [17]. Por otro lado, se ha planteado que RhIR podría unirse a otro AI que le permita adoptar una conformación distinta a la canónica y con ello reprimir o activar otros genes. La hipótesis anterior involucra a la proteína PqsE, una proteína con actividad tioesterasa —la cual forma parte del tercer sistema de QS, llamado Pqs— y que podría favorecer la actividad no-canónica de RhIR [21].

Además de los reguladores transcripcionales involucrados en la expresión del sistema Rhl, se han identificado otros mecanismos que controlan su expresión, por mencionar algunos: 1) la formación de estructuras secundarias que funcionan como un termómetro de ARN y controlan la expresión del gen *rhIA* [22]; 2) la expresión de RsmA, un regulador post-transcripcional que reprime la traducción de *rhII* [23]; 3) la expresión de RhIS, un ARN pequeño no codificante (sARN) que evita la represión generada por el ARN anti-sentido (AsRhIS), el cual reprime la

transcripción de *rhlI* [24] y 4) la expresión de PhrD, otro sARN que regula positivamente la expresión del gen *rhlR* [25]. Lo anterior demuestra la compleja regulación de sistema Rhl y resalta la importancia de este sistema para la fisiología y virulencia de *P. aeruginosa*.

1.2.3. Sistema Pqs

El tercer sistema de QS fue caracterizado en el año 2001. Este circuito no es homólogo de los sistemas LuxR/I, sino que se basa en la síntesis y detección de alquil-quinolonas (AQs). Aunque se han identificado más de 50 tipos de AQs, solo las moléculas 2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona (PQS), 2-heptil-4(1H)-quinolona (HHQ) y 4-hidroxi-2(1H)-quinolona (DHQ), pueden unirse al regulador transcripcional PqsR (también conocido como MvfR), un miembro de la familia de los reguladores transcripcionales LysR. La unión del complejo PqsR-AQ en la región promotora de los operones *pqsABCDE* y *phnAB* permite formar un circuito de auto-regulación positiva que incrementa la producción de AQs.

La activación del sistema Pqs es importante para la producción de piocianina (PYO), una fenazina tricíclica con actividad redox. En medios de cultivo ricos, el complejo PqsR-PQS está involucrado en la producción de PYO, mientras que en condiciones de estrés —bajos niveles de oxígeno o fosfato— participa el complejo PqsR-HHQ [15]. Para la producción de PYO, la proteína PqsE (codificada por el último gen del operón *pqsABCDE*) interactúa con sistema RhlR, para activar la transcripción los operones reiterados —llamados *phzA₁-G₁* (*phz1*) y *phzA₂-G₂* (*phz2*)— encargados de la biosíntesis de piocianina a partir del ácido corísmico. Esto sugiere que los elementos bajo el control del sistema Rhl pueden ser co-dependientes de PqsE y de esta manera adaptarse para controlar la producción no solo de piocianina [26], sino también de elastasa y ramnolípidos; ya que la sobre-expresión de la proteína PqsE también favorece la expresión de los genes *lasB* y *rhlA* [27, 28]. Así mismo, se ha observado que al aumentar la concentración de la molécula PQS también incrementa la expresión de los genes *pcrV*, *pcrH*, *exsC*, *exsB*, *exoS* y *spcS*, los cuales forman parte del sistema de secreción tipo III (SST3) [29]. Lo anterior

demuestra la importancia y versatilidad del sistema Pqs en el control de la virulencia de este patógeno oportunista.

1.3. Organización jerárquica de los sistemas de QS

Mientras la bacteria crece hay una expresión basal de los elementos de los sistemas de QS. Para evitar una activación prematura del sistema, los reguladores transcripcionales son atrapados por las proteínas anti-activadoras QteE, QscR y QslA, hasta que son desplazados por el incremento en la concentración de los AI [14]. Por esta razón, la activación de los sistemas de QS incrementa en la fase logarítmica tardía ($DO_{600} > 0.8$), cuando la concentración de AI es suficiente para unirse y activar a sus reguladores transcripcionales [30].

A pesar de que cada sistema de QS tiene un regulón particular, estos se organizan en una cascada regulatoria. El sistema Las regula positivamente al sistema Rhl al activar directamente la expresión de los genes *rhIR* y *rhII*, además activa los genes *pqsR* y *pqsH* que forman parte del sistema Pqs, por lo tanto, se propone que el sistema Las se encuentra en la cima de esta cascada [31]. Una vez que se activa el sistema Rhl, este a su vez favorece la transcripción del operón *pqsABCDE*, pero reprime la expresión de *pqsR* —componentes del sistema Pqs. La unión del complejo RhIR-C₄ tiene un efecto positivo en la expresión del operón *pqsABCDE*, sin embargo, se produce un ARNm largo que adopta una estructura secundaria que impide el acceso al sitio de unión al ribosoma (RBS) e impide su traducción. En este sentido, el resultado que ejerce RhIR sobre PqsA es un efecto post-transcripcional negativo que disminuye la síntesis PQS en la cepa PA14 [32]. Por su parte, se ha propuesto que el sistema Pqs regula de manera positiva a los sistemas Las y Rhl al favorecer la expresión de los genes *lasI* y *rhII* [33]. Esta organización jerárquica permite que la bacteria controle su virulencia de manera coordinada cuando alcanzan una densidad celular suficiente para establecer una infección (Figura 2). Debido a la importancia de los sistemas de QS, sus elementos se han convertido en blancos terapéuticos para el desarrollo de estrategias anti-QS.

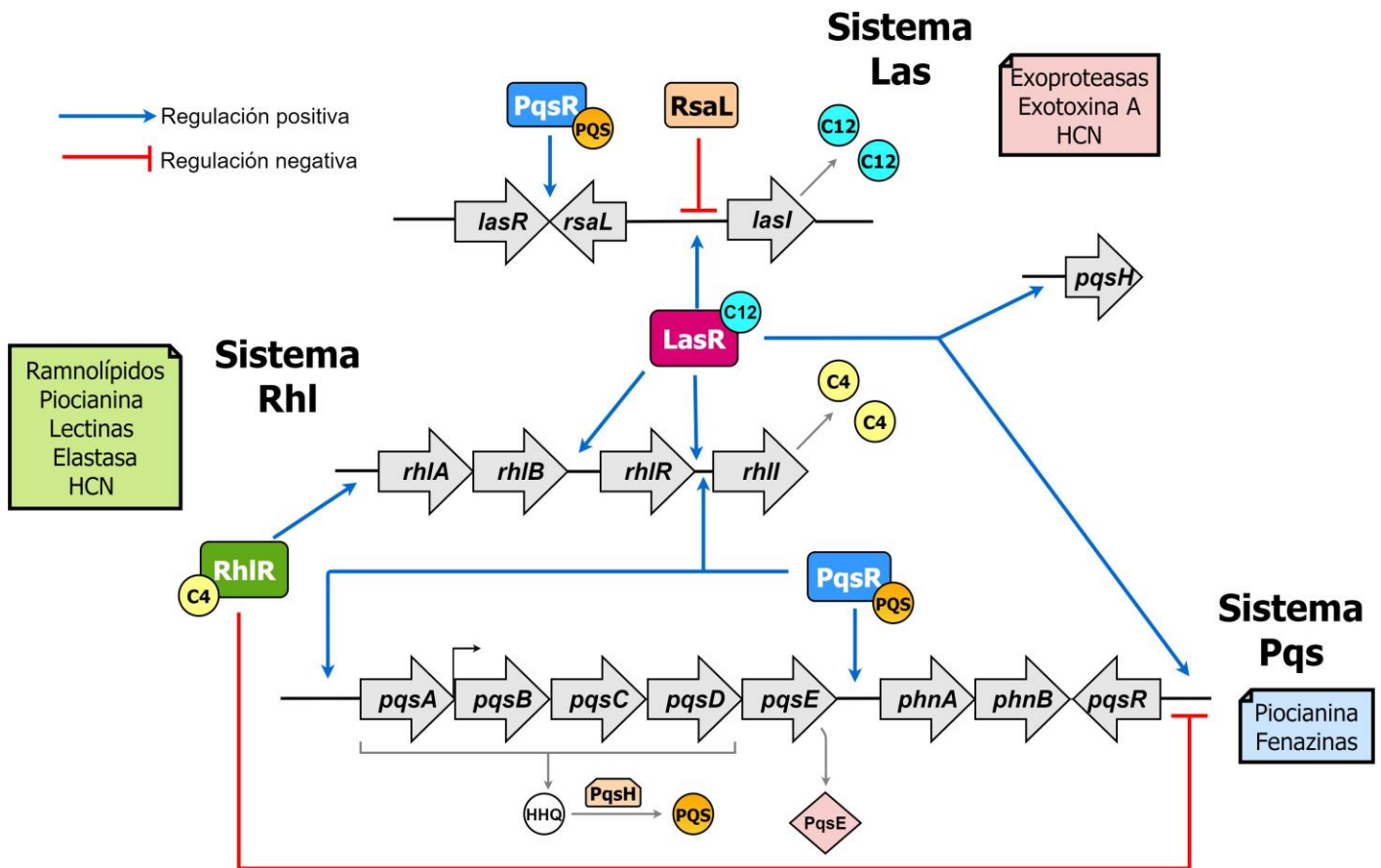


Figura 2. Organización jerárquica de los sistemas de QS en *P. aeruginosa*. Cada sistema regula directamente la expresión de un grupo particular de genes, los cuales están involucrados en la producción de diversos factores de virulencia. Los sistemas se organizan en una cascada regulatoria con el sistema Las en la cima. El sistema Las activa a los sistemas Rhl y Pqs, mientras que el sistema Rhl regula negativamente al sistema Pqs, pero éste a su vez regula positivamente a los sistemas Las y Rhl. La actividad de los sistemas Las y Rhl controla la expresión de 6 al 10% del genoma de la cepa PAO1. [Modificado de referencia 15].

1.4. Máquinas de secreción bacteriana

Para adaptarse e infectar, las bacterias secretan factores de virulencia con la finalidad de inhibir la respuesta inmunológica del huésped, hidrolizar compuestos de carbono, secuestrar moléculas, y/o favorecer mecanismos de resistencia antimicrobiana y desintoxicación. Sin embargo, algunos factores de virulencia no pueden difundir libremente por las membranas bacterianas, por lo cual deben ser secretados mediante sistemas especializados [34]. Se han descrito nueve sistemas de secreción (SST1 al SST9) algunos de los cuales están conservados en los tres dominios de la vida y se clasifican con base en los mecanismos generales de secreción Sec y Tat, los cuales son utilizados para el ensamblaje de estos complejos multiproteicos en las membranas celulares [35,36] (Tabla 1). *P. aeruginosa* posee cinco sistemas de secreción (SST1, SST2, SST3, SST5 y SST6); de ellos, el SST2 permite la secreción de elastasa y el SST6 secreta indirectamente PQS, ambos productos son factores de virulencia regulados por QS [37] (Figura 3).

1.5. Sistema de secreción tipo III (SST3) de *P. aeruginosa*

Además de producir diversos factores de virulencia, que son regulados por los sistemas de QS, *P. aeruginosa* posee un determinante crítico de su virulencia, el SST3 o inyectorio, mediante el cual inyecta toxinas directamente en el citoplasma de la célula blanco [38]. Este sistema multiproteico de aproximadamente 6.4 MDa, tiene relación evolutiva con el flagelo bacteriano, y aunque no se ha identificado un ancestro común, se ha propuesto que el flagelo cambio su función de movilidad por una función secretora, para adaptarse e infectar eucariontes. Adicionalmente, se descubrió que el SST3 está conservado en diversas bacterias patógenas de mamíferos y plantas [39]. La actividad secretora del SST3 es contacto-dependiente, aunque se desconocen las señales y el mecanismo molecular que activan al SST3. Sin embargo, se puede lograr una inducción *in vitro* utilizando medios de cultivo con concentraciones mM de Mg^{2+} y μM de Ca^{2+} que activan la secreción [38, 39].

Tabla 1.- Máquinas de secreción bacteriana

Sistema	Clasificación	Características	Mecanismo	Sustratos
SST1	Sec-Tat independiente	Relación evolutiva con bombas de eflujo, involucradas en la resistencia antimicrobiana.	La proteína citoplasmática IMC, reconoce secuencias repetidas de glicina en el CTD de la proteína. La asociación IMC-MFP-ToIC permiten la abertura del canal con hidrólisis de ATP para liberar al sustrato.	Hemolisina (HlyA) de <i>E. coli</i>
SST2	Sec-Tat dependiente	Las proteínas Xcp de <i>P. aeruginosa</i> son homologas a Gsp de <i>E. coli</i> .	<u>Tipo pistón.</u> Cuando la proteína hace contacto con la secretina se estimula la función de ATPasa (XcpE) para retraer el pili (XcpG) y empujar las proteínas.	Elastasa
SST3	Sec-Tat independiente	Relación evolutiva con flagelo bacteriano	<u>Secreción contacto dependiente</u> Funciona como una jeringa molecular que permite el traslado de exotoxinas.	Exotoxina S, T, Y, U Flagelina Espermidina
SST4	Sec-Tat independiente	Involucrado en transferencia horizontal de genes	<u>Formación de pili para adhesión celular</u> (VirB11 – VirB4) <u>Secreción de DNA contacto dependiente</u> La cual es mediada por mecanismos de conjugación bacteriana (VirB11 – VirD4).	Transferencia de DNA plasmídico
SST5	Sec-Tat dependiente	-----	<u>Sustratos autosecretables</u> Tienen su propio dominio barril-β que se inserta en membrana, se pliega por chaperonas para formar un canal y sale.	Proteasa de inmunoglobulina A
SST6	Sec-Tat independiente	Relación evolutiva con tallos contráctiles de fagos	<u>Secreción contacto dependiente</u> El tallo (polímero de hemolisina) cargado con efector se encuentra en una vaina citoplasmática anclada a membrana que se contrae por señal extracelular.	Secreción indirecta de PQS y sideróforos.
SST7	-----	Identificado en <i>M. bovis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> y <i>B. anthracis</i> .	Se desconoce	-----
SST9	Sec dependiente	Presente en el 62% de todos los Bacteroidetes. principales patógenos orales.	Complejo de 16 proteínas y 2 reguladores.	-----

Se muestran los principales sistemas de secreción y algunas de las características más relevantes. [Modificado de referencias 35, 36]

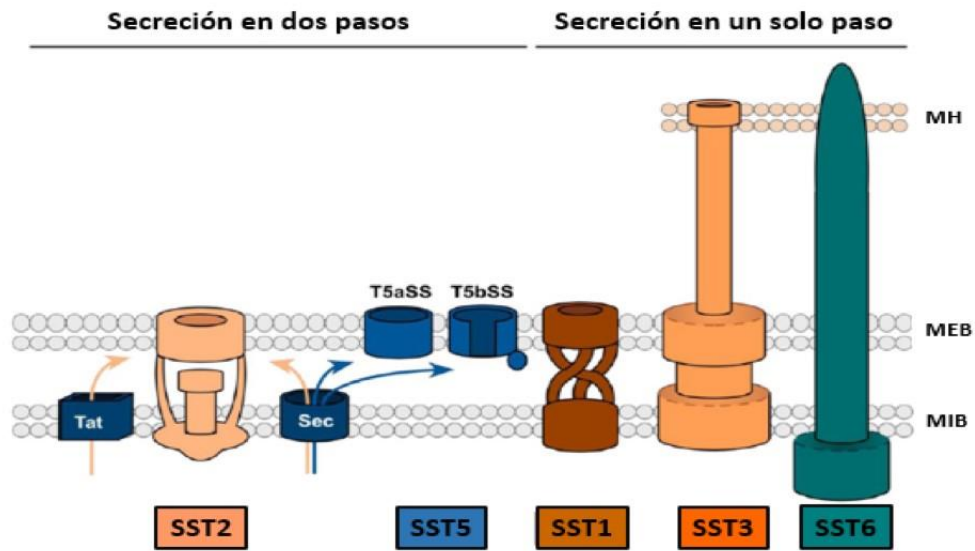


Figura 3. Sistemas de secreción de *Pseudomonas*. La clasificación de los sistemas de secreción se realiza con base en el tipo de mecanismo implicado en su biogénesis. MH, membrana del huésped; MEB, membrana extracelular bacteriana; MIB, membrana interna bacteriana. **[Modificado de referencia 36].**

El SST3 de las bacterias *Yersinia* spp, *Aeromonas salmonicida*, *Photobacterium luminescens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bordetella* spp, *Desulfovibrio vulgaris* y *P. aeruginosa* se agrupan en la familia Ysc. La función del SST3 es similar, pero cada especie tiene vías de regulación, proteínas efectoras; estrategias de infección y nichos de vida diferentes.[40].

En *P. aeruginosa* las proteínas que conforman el SST3 están codificadas en 43 genes, 36 de ellos organizados en 5 operones que se ubican en una región de 25.7 kpb (Figura 4). Estos genes codifican las proteínas necesarias para la formación del cuerpo basal, aparato exportador, complejo clasificador, filamento, translocadores y proteínas reguladoras (Figura 5). El resto de los genes están distribuidos en el cromosoma y codifican las proteínas chaperonas, así como las toxinas ExoS, ExoT, ExoY y ExoU. El SST3 permite la manipulación la respuesta inmune, dinámica del citoesqueleto, transporte vesicular y transducción de señales de la célula que infecta; lo cual favorece la patogenicidad de la bacteria [41].

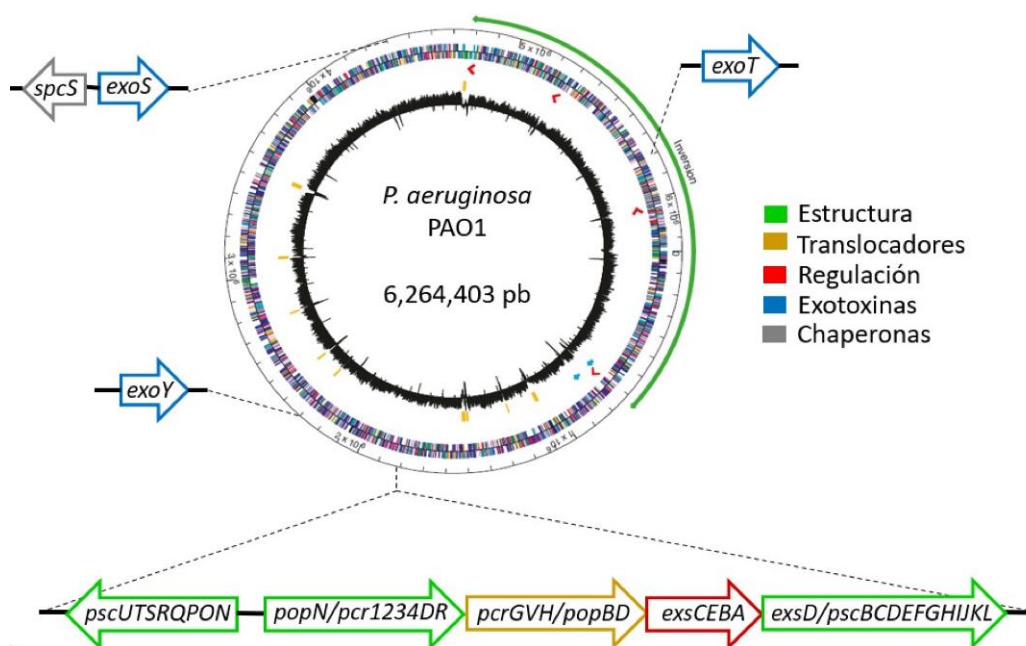


Figura 4.- Esquema de la organización cromosómica de los genes del SST3 en *P. aeruginosa* PAO1. El conjunto de genes responsables de la formación de esta nanomáquina molecular está organizado en 43 genes, 36 de ellos dispuestos en una isla de patogenicidad de 25.7 kpb y organizados en 5 operones. Las exotoxinas y chaperonas están distribuidos en el resto del cromosoma. [Modificado de referencia 41]

1.5.1. Estructura del SST3

Se compone por más de 25 proteínas, para las cuales se asignaron nombres únicos según la bacteria en donde fueron descubiertas, lo que vuelve un poco confusa la comparación. El prefijo Sct (*secretion and cellular translocation*) se utiliza como nomenclatura unificada para los componentes conservados. Sin embargo, para referirse al SST3 de *P. aeruginosa* se utiliza el prefijo Psc (Tabla 2). [38] Sus principales componentes se describen a continuación:

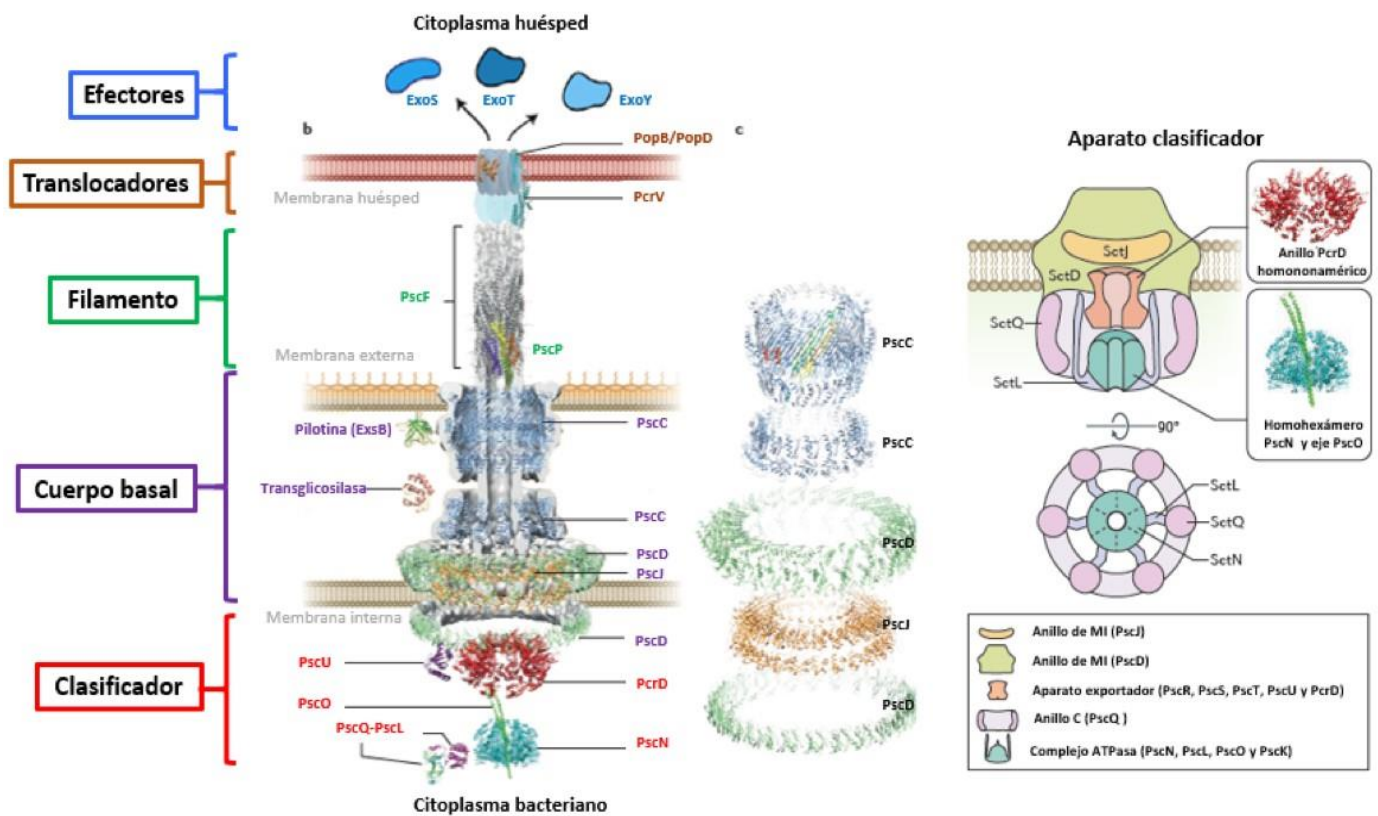


Figura 5.- Estructura del SST3 de *P. aeruginosa*. Se muestra un esquema de los principales componentes del SST3, se sugiere revisar la Tabla 2 para una descripción detallada sobre la función cada proteína. [Modificado de las referencias 38, 39].

Tabla 2.- Principales componentes estructurales del SST3 de *P. aeruginosa*

Estructura	Nomenclatura unificada	Flagelo	<i>P. aeruginosa</i>	Función propuesta	Principal operón que los codifica en PAO1
Cuerpo basal	SctC	-----	PscC	Anillo externo	<i>pscBCDEFGHIJKL</i>
	-----	-----	ExsB	Pilotina	
	SctD	FliG	PscD	Anillo interno	
	SctJ	FliF	PscJ	Anillo interno	
	SctF	FlgE	PscF	Aguja o filamento	
	SctI	-----	PscI	Anillo interno	
	-----	FlgJ	-----	Transglicosilasa	
Aparato de exportación	SctU*	FliB	PscU	Auto-proteasa	<i>pscUTSRQPON</i> <i>popNpcr1234DR</i>
	SctV*	FliA	PcrD	Compuerta exportadora	
	SctR	FliP	PscR	Anillo interno	
	ScrS	FliQ	PscS	Anillo interno	
	SctT	FliR	PscT	Anillo interno	
Complejo clasificador	SctQ	FliM-FliN	PscQ	Anillo C	<i>pscUTSRQPON</i> <i>exsDpscB-L</i>
	SctN*	FliI	PscN	ATPasa	
	SctL	FliH	PscL	Estator	
	SctO	FliJ	PscO	Eje	
	SctK	----	PscK	Cofactor de ATPasa	
Interruptores	SctP*	FliK	PscP	Longitud de filamento	<i>pscUTSRQPON</i> <i>popNpcr1234DR</i>
	SctW*		PopN	Interruptor	
Translocadores	SctB	----	PopD	Poros translocador	<i>pcrGVHpopBD</i>
	SctE	----	PopB	Poros translocador	
	SctA	FliC	PcrV	Punta de aguja	
	----	----	PcrG	Interruptor	

Se muestra la nomenclatura unificada y particular de los principales componentes del SST3 de *P. aeruginosa*, así como sus homólogos flagelares. Se menciona su función y el operón biosintético, principales. No se muestran todos los elementos, ya que de algunos se desconoce su función o no se han identificado. * Proteínas que regulan el orden de secreción [Modificado de referencia 38].

1.5.1.1. Cuerpo basal

Está formado por anillos hidrofóbicos que permiten el anclaje a ambas membranas bacterianas. Las proteínas PscJ y PscD forman anillos centrales en la membrana interna, mientras que la secretina PscC forma el anillo externo guiada por la pilotina ExsB **[38, 42]**.

1.5.1.2. Aparato exportador

Se ubica en el citoplasma bacteriano, por debajo del cuerpo basal. Se estructura de manera compleja por las proteínas PscR, PscS, PscT, PscU y PcrD, que se organizan en pentámero con PscR en el centro y PcrD en los extremos. Esta estructura se asocia con la ATPasa (PscN) y funciona como puerta de entrada para los sustratos hacia el filamento **[38]**.

1.5.1.3. Complejo clasificador

Se ubica debajo del aparato exportador y se une al cuerpo basal mediante la proteína PscI. Se compone por el anillo C —complejo de proteínas PscQ, PscO (eje), PscL (estator) y PscK— y la proteína PscN (ATPasa). Su función es reconocer los complejos efector-chaperona, para desplegar al efector y permitir que pase hacia el aparato exportador **[38, 39]**.

1.5.1.4. Filamento o aguja

Se compone por más de 100 unidades de la proteína PscF y forma un conducto que mide de 2 a 2.5 nm de ancho por 60 a 80 nm de largo, cuya longitud es controlada por la proteína PscP **[43]**. El filamento rota y permite el transporte de los efectores mediante la fuerza protón motriz (FPM) derivado del gradiente de protones que fluye desde el periplasma hacia el citoplasma por mecanismo similares a los descritos en para la rotación del flagelo y la ATP sintasa mitocondrial **[44]**. Sin embargo, en un estado inactivo, la punta del filamento está cubierta por la proteína PcrV, lo cual adopta una conformación que bloquea la salida de efectores en algunas bacterias **[43]**.

1.5.1.5. Translocadores

Cuando la secreción se activa, la proteína PcrV cambia su conformación y permite la exportación de las proteínas translocadoras PopB y PopD, las cuales identifican señales en la superficie de la célula huésped — como al receptor CCR5, señales de sulfatación, fucosilación, presencia de colesterol y/o vimentina— para formar el complejo PopB-PopD, el cual forma poros sobre la superficie de la célula huésped; lo anterior, permite la salida de iones y modifica la osmolaridad de la célula huésped, lo cual puede ser fatal para la célula eucariota. Sin embargo, si la célula eucariota no muere, entonces el complejo PopB/D se asocia con la proteína PcrV del filamento, para formar el complejo translocador y de esta manera se forma un conducto que conecta ambos citoplasmas y permite la liberación de exotoxinas [45]. La formación del complejo PopB-PopD puede considerarse como un inmunógeno con actividad similar a las toxinas formadoras de poro que son dependientes de colesterol como listeriolisina, perfringolisina y pneumolisina [46].

1.5.1.6. Proteínas que regulan la jerarquía de secreción

Los sustratos son secretados en orden temporal y secuencial. Para ello, las proteínas PscU y PscP controlan la secreción de sustratos tempranos (componentes de los anillos internos y aguja) permitiendo que el filamento se extienda. Mientras que, PcrD junto con PscU controlan la secreción de sustratos medios (translocadores) para la formación del poro translocador en la membrana huésped. Finalmente, las proteínas PscN, PopN y la chaperona PcrG controlan la secreción de sustratos tardíos (efectores) para liberar exotoxinas y generar daño [38]. La región central de la proteína PcrG —chaperona del translocador PcrV— se asocia con la proteína PscO, la cual a su vez regula la FPM que permite la rotación del filamento; mientras que el extremo CTD se asocia con el complejo PopN-PcrD para bloquear el acceso al exportador. [47].

1.5.1.7. Efectores

P. aeruginosa posee los genes *exoS*, *exoT*, *exoY* y *exoU*, los cuales codifican para sus respectivas exotoxinas, y que poseen diferente actividad enzimática. Su

ubicación es aleatoria en el cromosoma, pero cerca de genes que codifican para sus proteínas chaperonas. Sin embargo, no se han identificado los cuatro genes en una sola cepa de *P. aeruginosa*, lo cual muestra una distribución excluyente entre la presencia de los genes *exoS* en las cepas del clado I (cepa PAO1) y *exoU* en cepas del clado II (cepa PA14). Las exotoxinas se traducen como proteínas inactivas para no dañar a la bacteria que las produce, sus dominios catalíticos son activados por cofactores presentes en el citoplasma eucariota. El grupo de exotoxinas no garantiza el poderío infeccioso, por lo cual, la versatilidad funcional depende de la especie. ExoU posee actividad de fosfolipasa, por lo cual induce apoptosis celular. ExoY posee actividad de adenilato ciclasa que incrementa el cAMP intracelular e interrumpe funciones de células pulmonares. Mientras que, ExoT y ExoS comparten un 76% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos y poseen dominios bifuncionales que modifican la dinámica del citoesqueleto y la transducción de señales, lo cual favorece la supervivencia de la bacteria y la evasión de la respuesta inmune del huésped [48]. *P. aeruginosa* es considerada una bacteria extracelular, pero posee una etapa intracelular transitoria que favorece su persistencia y resistencia a los antibióticos [49] (Figura 6 y Tabla 3).

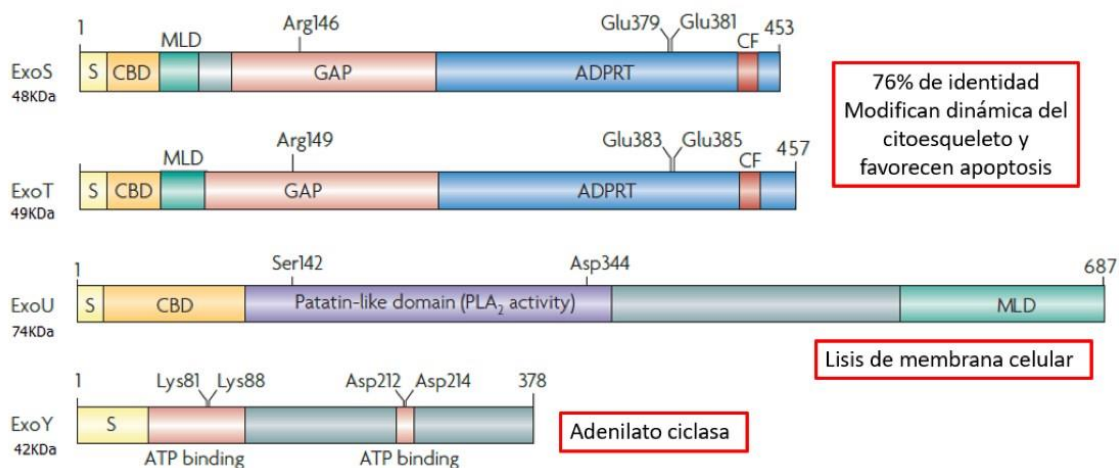


Figura 6.- Dominios catalíticos de las exotoxinas de *P. aeruginosa*. Se muestran la extensión y función de los dominios de unión a chaperona (CBD); secuencia señal (S); actividad de GTPasa (GAP); ADP ribosil-transferasa (ADPRT); fosfolipasa (PLA₂); y de unión al ATP. Los dominios se activan al entrar en contacto con factores del citoplasma el huésped [Modificado de referencia 48].

Tabla 3.- Características de las exotoxinas de *P. aeruginosa*

Exotoxina	Tamaño (KDa)	Chaperona asociada	Dominio enzimático	Sustrato	Cofactor de activación	Efecto
ExoS	48	SpcS	GAP (NTD)	Rho, Rac	Proteínas tipo 14-3-3	Desorganización del citoesqueleto
			ADPRT (CTD)	Ras	--	Inhibición de la síntesis de proteínas. Apoptosis y piroptosis en células inmunes
ExoT	49	SpcS	GAP (NTD)	Rho, Rac	Proteínas tipo 14-3-3	Desorganización del citoesqueleto
			ADPRT (CTD)	CRKI, CRKII		Apoptosis
ExoU	74	SpcU	PLA ₂	Fosfolípidos	Cu ²⁺ , Zn ²⁺	Necrosis.
ExoY	42	--	Adenilato ciclasa	ATP	--	Incrementa cAMP intracelular (penetración y permeabilidad)

Abreviaturas: GAP (GTPasa); ADPRT (ADP ribosil-transferasa); PLA₂ (fosfolipasa A₂); Rho (GTP); Rac/Ras (familia de proteínas G pequeñas que son transductores de señales); CRKI (proteínas-cinasas dependientes de calcio); NTD (dominio amino-terminal); CTD (dominio carboxilo-terminal). **[Modificado de referencia 48]**

1.6. Regulación transcripcional del SST3

La activación de la secreción del SST3 es contacto-dependiente; sin embargo, se puede inducir experimentalmente utilizando medios de cultivo con concentraciones mM de Mg^{2+} y μM de Ca^{2+} , lo cual sugiere la intervención de múltiples sistemas reguladores involucrados en el control del SST3; algunos de los cuales controlan actividades celulares como motilidad, producción de polisacárido, formación de biopelículas, etc., en respuesta a señales ambientales. A pesar de que los mecanismos moleculares aún son desconocidos, parecen estar acoplados al estado del metabolismo celular e integradas dentro de un circuito maestro que asimila señales endógenas y exógenas [41, 50].

1.6.1. Regulación intrínseca

1.6.1.1. Regulador maestro del SST3

ExsA es el regulador central del SST3 en *P. aeruginosa*, se ubica en el citoplasma bacteriano y pertenece a la familia de reguladores tipo AraC/XylS, los cuales generalmente están involucrados en el metabolismo de carbono, respuesta a estrés y patogénesis. Este tipo de reguladores poseen un dominio amino terminal (NTD) —para el reconocimiento del ligando— y un dominio carboxilo terminal (CTD) con motivos hélice-vuelta-hélice para la unión al ADN [40]. La proteína ExsA reconoce la secuencia consenso (tAaAAAnwnMy**GrC**ynnnm**YTG**ayAk) ubicada a 45 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del operón *exsCEBA* (P_{exsC}) para formar un circuito de auto-regulación positiva. La activación de este promotor permite una fuerte expresión de *exsA* como último elemento de un ARNm policistrónico [49] (Figura 7).

ExsA comparte un 79% de identidad con su homólogo LcrF de *Yersinia pestis*. Se ha demostrado que la expresión de *exsA*, desde un plásmido, es capaz de complementar una mutante en *lcrF* y viceversa. Sin embargo, sus propiedades de unión son distintas, ExsA dimeriza directamente sobre el ADN, mientras que LcrF dimeriza y después se une [50].

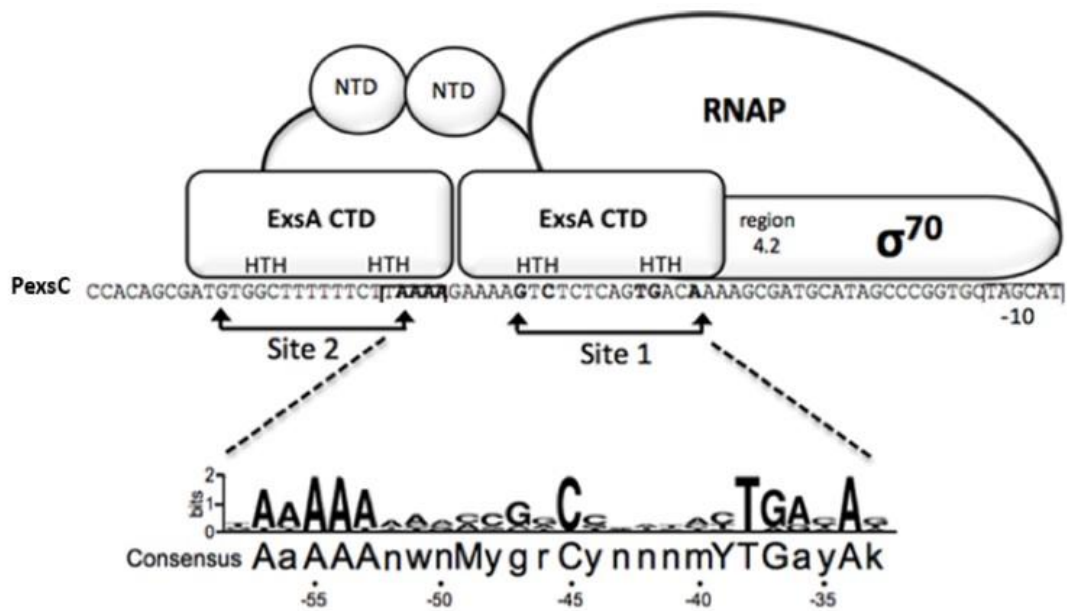


Figura 7.- Modelo del reconocimiento de promotores dependiente de ExsA y reclutamiento del complejo σ^{70} - RNA polimerasa. El regulador transcripcional ExsA se une de manera secuencial al promotor para formar un dímero. ExsA clasifica como un regulador tipo II, debido a que interactúa con el factor sigma 70 para iniciar la transcripción de sus genes blanco **[Modificado de referencia 40]**

Por otra parte, además de controlar al SST3, un análisis de ChIP-seq demostró que ExsA regula al menos 1249 genes, de los cuales puede unirse directamente a 17 promotores (incluidos genes del SST3), algunos de ellos han sido verificados por ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) y su actividad ha sido evaluada por qRT-PCR [51]. Las cepas que carecen del gen *exsA*, no pueden expresar los genes del SST3 y su virulencia —dependiente del SST3— se atenúa en cultivos celulares y en diversos modelos de infección. Por lo anterior, se han desarrollado compuestos que bloquean la actividad de ExsA y que funcionan como inhibidores de la virulencia de *P. aeruginosa* [52].

1.6.1.2. Cascada ExsCEDA

La actividad de ExsA es controlada por un mecanismo intrínseco, que se basa en su captura y liberación, también llamado cascada ExsCEDA. Este mecanismo involucra la participación de ExsA (activador) y las proteínas ExsC (anti-antiactivador), ExsE (proteína secretada) y ExsD (antiactivador), las cuales son codificadas por el operón *exsCEBA* y el gene *exsD*, respectivamente. En condiciones no-permisivas (ausencia de señales inductoras), los componentes del SST3 se expresan en niveles basales, es decir la maquinaria está parcialmente formada, lista para iniciar la respuesta defensiva. Cuando la secreción esta apagada, en el citoplasma bacteriano el regulador ExsA es atrapado por ExsD, mientras que ExsE forma complejo con ExsC [53]. Este fino equilibrio se altera en presencia de señales inductoras las cuales —por mecanismos aún desconocidos— permiten la activación de la secreción y la exportación de la proteína ExsE. Como resultado, disminuye la concentración citoplasmática de ExsE, por lo cual ExsC queda libre para formar un complejo con ExsD. De esta manera, el regulador ExsA queda libre para activar la expresión de los todos los genes del SST3 [54]. Este mecanismo de regulación intrínseca permite magnificar la expresión del SST3, incrementando el número de inyectisomas activos (Figura 8). Además, esta conservado en algunos miembros de la familia Ysc [53].

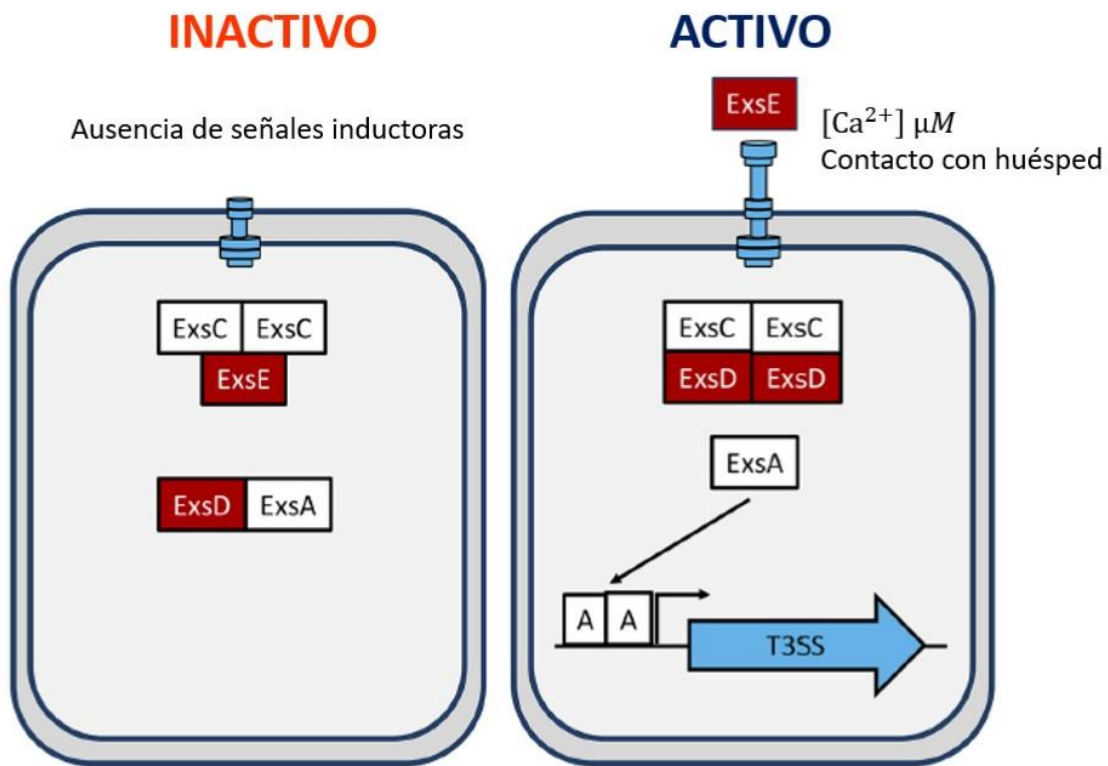


Figura 8.- Mecanismo de regulación intrínseca que controla la liberación de ExsA. Cuando la secreción esta apagada, el regulador ExsA está atrapado por el anti-activador ExsD. Si la proteína ExsE es liberada, entonces el anti anti-activador ExsC se une a ExsD y así ExsA queda libre para poder unirse a los promotores de los genes que regula y activar de manera súbita la expresión del SST3. **[Modificado de referencia 54].**

1.6.2. Regulación extrínseca del SST3

Además de la regulación intrínseca, existen otras vías de regulación que controlan la disponibilidad de ExsA. Se han identificado al menos 30 productos de genes que afectan la expresión del SST3, la mayoría afectan la expresión transcripcional o post-transcripcional del regulador ExsA desde alguno de los dos sitios promotores que permiten la expresión del gen *exsA* [54] y que a continuación se describen:

1.6.2.1 Control de la actividad desde el promotor P_{exsC} .

La actividad del promotor del operón *exsCEBA* (P_{exsC}), además de ser regulado positivamente por ExsA, es controlado por regulador transcripcional PsrA, un miembro de la familia TetR. La activación de la transcripción mediada por PsrA depende de la baja concentración de ácidos grasos de cadena larga (LCFAs por sus siglas en inglés), como resultado de procesos de alta demanda metabólica como la β -oxidación. PsrA se une al promotor P_{exsC} y lo regula positivamente [55].

1.6.2.2. Control de la actividad desde el promotor interno P_{exsA}

Este promotor interno se ubica en la región intergénica que forman los genes *exsB* y *exsA*. La activación de P_{exsA} permite la transcripción de un ARNm monocistrónico de *exsA*, pero al no depender de ExsA, su activación es menor comparada con el promotor P_{exsC} . La expresión de este promotor es regulada por: la unión del complejo Vfr-cAMP —aproximadamente a 42 pb hacia arriba del sitio de inicio de la transcripción— en respuesta a la activación de sistemas de mecano-transducción de señales o por estrés hiperosmótico [52]. Sin embargo, se han identificado sitios putativos de unión a Fis, una proteína asociada a nucleóide, que se une al ADN y favorece su apertura [56]; VqsM, un regulador transcripcional tipo AraC [57]; y MvaT/U, proteínas asociadas al nucleóide tipo histona que reprimen la expresión de genes al competir por los factores transcripcionales o al interferir con la formación del complejo σ^{70} -ARN polimerasa [58]. La expresión de P_{exsA} podría encargarse de mantener parcialmente estructurado al SST3 en condiciones no permisivas.

1.7. Control post-transcripcional de ExsA

El sistema Gac/Rsm es importante para controlar el cambio entre los fenotipos de infección aguda y crónica de *P. aeruginosa*. La proteína RsmA (ortólogo de CsrA de *E. coli*) reconoce motivos GGA, presentes en las estructuras secundarias de los ARNm, para modular su eficiencia de traducción. Aunque se desconoce el mecanismo molecular, RsmA estimula la expresión del SST3 mediante alguno de los siguientes mecanismos: 1) favorece la estabilidad del ARNm de los genes *vfr* y *cyaB*, lo cual incrementa la cantidad del complejo Vfr-cAMP e impacta en la actividad del promotor interno P_{exsA} ; 2) favorece la eficiencia de traducción del transcrito de *exsA*; y 3) disminuye los niveles de c-di-GMP, un regulador negativo del SST3 [59].

Sin embargo, la actividad de RsmA es controlada por los ARNs pequeños no traducidos (sARNs) llamados RsmZ, RsmY, RsmV y RmsW, los cuales secuestran a la proteína RsmA y antagonizan su actividad. A su vez, la expresión de estos sARNs es controlada por el sistema de dos componentes GacS/GacA, mientras que este último es modulado negativamente por la histidina cinasa híbrida de membrana RetS y positivamente por la histidina cinasa LadS (en respuesta a altas concentraciones de calcio extracelular) [60]. Además del sistema Gac, existen otros factores que controlan de manera indirecta la actividad de RsmA, por ejemplo: la polinucleótido fosforilasa (PNPasa) que estabiliza a RsmY y RsmZ [61]; la proteína TspR, que reprime la transcripción de RsmY y RsmZ [62]; y el regulador CysB que controla la expresión de RetS [63]. En este sentido, el control de la actividad de la proteína RsmA es un factor importante para el control del SST3, por lo cual la inactivación de *rsmA* abate la expresión de ExsA e inactiva al SST3 [59]. Adicionalmente a RsmA existe una helicasa dependiente de ATP, llamada DeaD, la cual modifica la estructura que adopta el ARNm de *exsA* para favorecer el acceso al RBS y mejorar su eficiencia de traducción. Esta función es similar al efecto de RsmA, por lo cual ambas favorecen la traducción de *exsA* [54].

Además del control por proteínas reguladoras, se ha demostrado la participación de los segundos mensajeros cAMP (activador del SST3) y del c-di-GMP (inhibidor del SST3); cuya producción es multifactorial [64, 65]. No obstante, podrían existir vías de regulación a la espera de ser descritas. En la figura 9 se presenta un diagrama de los principales componentes involucrados en la regulación de ExsA.

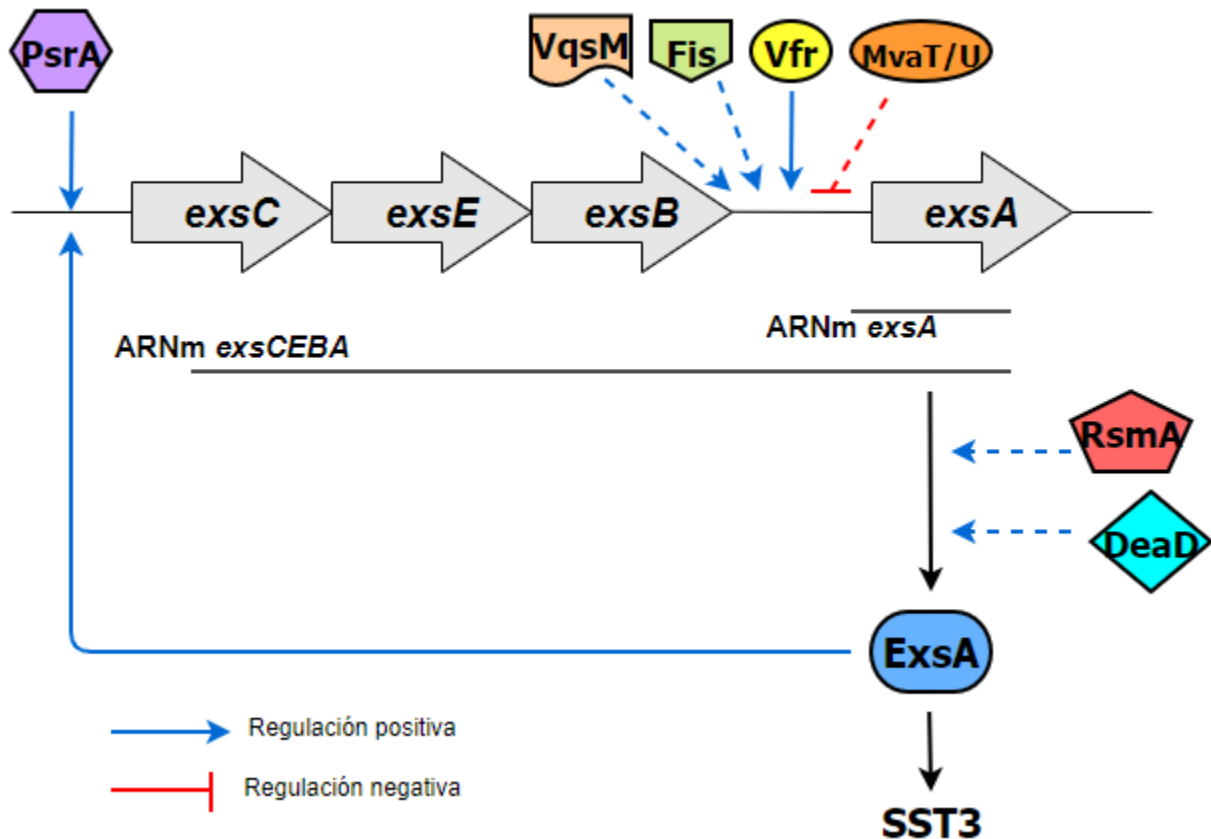


Figura 9.- Mecanismos de regulación que controlan la expresión de ExsA. A nivel transcripcional PsrA es un regulador positivo del operón regulador *exsCEBA*. Mientras que, Vfr controla la expresión del promotor interno de *exsA*. Además, existen sitios de unión putativos para VqsM y Fis en la región promotora de *exsA*. A nivel post-transcripcional las proteínas RsmA y DeaD modifican la traducción de ExsA. El regulador ExsA forma un circuito de auto-regulación positiva al unirse al promotor del operón *exsCEBA* y regula positivamente todos los genes del SST3. [Modificado de referencia 54].

CAPÍTULO II.- ANTECEDENTES

Considerando la importancia de los sistemas de QS y el SST3 en la patogenicidad de bacterias Gram negativas, varios grupos de investigación han tratado de determinar la relación que existe entre ambos sistemas; sin embargo, los mecanismos, hasta ahora descritos, parecen ser particulares de cada cepa [35].

En *P. aeruginosa*, el análisis de microarreglos de cepas mutantes en los sistemas Las y Rhl, han demostrado que existe una relación con el SST3 [10, 11]. En 2004, Hogardt M y cols., realizaron ensayos a nivel de células individuales y reportaron que en altas densidades celulares el sistema Rhl y el factor sigma de fase estacionaria RpoS regulan de manera negativa la expresión del SST3, a través de cuantificar la actividad de la fusión traduccional *exoS'-gfp* en mutantes de los genes *rhIR*, *rhII* y *rpoS* de la cepa PAO1 [66]. Algo similar fue reportado en 2005 por Bleves S y col., quienes al evaluar fusiones transcripcionales construidas con el reportero *lacZ* y los promotores de genes representativos del SST3 en la cepa PAO1, demostraron que la inactivación del gen *rhII*, incrementa la expresión de genes del SST3 en medio inductor durante la fase estacionaria, sugiriendo que el sistema Rhl regula de manera negativa al SST3. Sin embargo, la expresión del operón *exsCEBA* no se modifica a pesar de ser el principal responsable de la autorregulación del SST3 en condiciones de inducción [67].

Por otro lado, se ha demostrado que la inactivación de los sistemas Las y Rhl no abate la virulencia de cepas clínicas de *P. aeruginosa*. En 2019 López-Jacome LE y cols., demostraron que el uso de la N-acil-homoserina-lactonasa AiiM —enzima que degrada a los autoinductores C₁₂ y C₄— disminuye la producción de factores de virulencia QS-dependientes, pero no afecta la secreción de exotoxinas por el SST3; aunque, no se demostró la inactivación del autoinductor PQS [68]. De igual manera, Soto-Aceves M y cols., reportaron que la doble inactivación de los genes *lasR* y *rhIR* en la cepa PAO1, disminuye la producción de factores de virulencia QS-dependientes (excepto la producción de quinolonas); sin embargo, no se suprime la virulencia de la bacteria en modelo de formación de absceso en ratón, lo cual se

asocia a que hay secreción de las exotoxinas S y T por el SST3 [69]. Además de observar que la inactivación de los sistemas Las y Rhl, parece no afectar la producción de PQS y quinolonas, estos trabajos sugieren que su inactivación no afecta la secreción de exotoxinas por el SST3 en cepas clínicas.

Sin embargo, lo anterior contrasta con los resultados obtenidos en 1999 por Rumbaugh K y cols., debido a que la doble inactivación de los genes *lasI* y *rhlI* en la PAO1 disminuye la diseminación de la bacteria en tejidos, por lo cual la bacteria es menos virulenta en modelo de infección de ratón quemado [70]. Adicionalmente, se ha demostrado que la inactivación del gen *rhlR* en las cepas clínicas, PAE90 y PA14, disminuye la virulencia de las cepas en diferentes modelos de infección, sin embargo, la inactivación de *rhlI* no afecta su virulencia [20, 71]. De igual manera, resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, sugieren que el regulador RhlR activa la expresión del SST3 en la cepa PAO1; ya que los niveles de las exotoxinas S y T, visualizados mediante Western Blot (WB), disminuyen al inactivar al gen *rhlR*. Este efecto se observa tanto en sobrenadante como en la fracción insoluble y los niveles de las exotoxinas se restauran a niveles similares de la cepa silvestre al *trans*-complementar con el gen *rhlR* bajo el control de un promotor independiente (datos no publicados).

Considerando la importancia de los sistemas de QS para la producción de diversos factores de virulencia, y por lo tanto la patogenicidad de la bacteria en diferentes cepas clínicas; es importante, describir el efecto regulatorio que ejercen los sistemas de QS sobre la actividad del SST3, con la finalidad de determinar si lo hacen de manera positiva o negativa en la cepa PAO1 y de ser así, poder sugerir si es de manera directa o indirecta.

CAPÍTULO III.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis:

Los sistemas de percepción de quórum o *quorum sensing* (QS) regulan la expresión de genes del SST3 en *P. aeruginosa* PAO1.

3.2. Objetivo general:

Analizar el efecto que ejercen de los sistemas de percepción de quórum sobre la regulación de los genes del SST3.

3.2.1. Objetivos particulares:

- Evaluar el efecto que producen las mutaciones sencillas en los elementos del sistema Rhl sobre la expresión de genes representativos del SST3.
- Evaluar el efecto que producen las mutaciones sencillas en el sistema Las sobre la expresión de genes representativos del SST3.
- Determinar el efecto de la doble inactivación de los genes *lasR* y *rhIR* sobre la expresión de genes representativos del SST3.

CAPÍTULO IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla MS1 del material suplementario. En todos los experimentos de expresión se utilizó la cepa de referencia *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 —la cual fue aislada de una herida en 1954 por Bruce Holloaway en Melbourne, Australia [72], mientras que la cepa *E. coli* DH5 α , fue utilizada como cepa de propagación para las técnicas de clonación. Para complementar la delección de los genes *rhIR* y *lasR*, se utilizaron los plásmidos pGMYC (*rhIR*⁺⁺) y pMT1 (*lasR*⁺⁺), los cuales sobre-expresan los genes estructurales *rhIR* y *lasR* bajo el control del promotor *p_{lac}*. Mientras que el plásmido pUCP20 se utilizó como control negativo o vector vacío.

Las cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli* fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) a 37 °C y 225 rpm, a menos que se especifiquen otras condiciones. Para los ensayos de expresión, el medio LB fue utilizado como medio no-permisivo, mientras que para la inducción del SST3, se utilizó medio LB suplementado con EGTA 5 mM y MgCl₂ 20 mM (medio inductor) [63]. Cuando fue necesario, como marcadores de selección, se utilizaron los antibióticos en las siguientes concentraciones finales, para *P. aeruginosa*: tetraciclina (Tc) 120 μ g/ml, estreptomycin (Sm) 200 μ g/ml, carbenicilina (Cb) 200 μ g/ml, apramicina (Apc) 150 μ g/ml. Mientras que para *E. coli*: tetraciclina (Tc) 15 μ g/ml, ampicilina (Amp) 200 μ g/ml y estreptomycin (Sm) 30 μ g/ml [73].

4.2. Técnicas de manipulación del ADN

El ADN genómico utilizado como ADN molde fue obtenido de la cepa PAO1 mediante el sistema de purificación de ADN GeneJET (*Thermo Scientific*®). Para construir los plásmidos y fusiones transcripcionales el ADN fue purificado y manipulado de acuerdo a técnicas estandarizadas [74]. Las enzimas de restricción y la enzima T4 ADN ligasa fueron obtenidas de *New England Biolabs*® y *Promega*®, respectivamente y se siguieron los protocolos recomendados para su uso. El diseño

de los oligonucleótidos se realizó con base en los datos genómicos de la cepa PAO1 que se encuentran disponibles en pseudomonas.com [5]. La síntesis de los oligonucleótidos y la secuenciación de ADN fue realizada por la unidad de síntesis y secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los oligonucleótidos y condiciones utilizadas para las reacciones de PCR se enlistan en la tabla MS2. Para amplificar las regiones de ADN se utilizó la enzima ADN-polimerasa de alta fidelidad Phusion (*Thermo Scientific*®). Los fragmentos de ADN fueron obtenidos de las bandas del gel de agarosa y purificados utilizando el protocolo de Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (*Promega*®)

4.3. Construcción de fusiones transcripcionales

Para la construcción de las fusiones transcripcionales se utilizó el plásmido mini-CTX-lux, que se integra al genoma de *P. aeruginosa*, mediante recombinación sencilla. Este vector contiene un marcador de resistencia a tetraciclina (Tc), y el grupo de genes reporteros *luxCDABE* como se reportó previamente [75]. Como control negativo inicialmente se utilizó el plásmido mini-CTX-lux (plásmido pX); sin embargo, en nuestras condiciones mostro una actividad basal alta, por lo que se reemplazó por el control negativo 2 (plásmido pX₂). Cada secuencia promotora fue amplificada con un par de oligonucleótidos específicos, asegurándonos de incluir los sitios de unión -10/-35 para la ARN polimerasa y el motivo de unión a ExsA, pero no el RBS. Los productos de PCR se purificaron y se clonaron entre los sitios XhoI y HindIII del vector mini CTX-lux. Para la digestión, el ADN purificado fue tratado con las endonucleasas XhoI y HindIII utilizando el buffer 2.1 en un volumen final de 40 µl que se incubó a 37 °C durante 2 h. Los productos de digestión (regiones promotoras y el vector mini CTX-lux) fueron sometidos a reacciones de ligación en relación 1:3 (vector: promotor) en un volumen final de 20 µl que se incubaron a 4 °C durante 12 h. La reacción de ligación fue movilizada por choque térmico a la cepa *E. coli* DH5α para su propagación. Después, las clonas de *E. coli* DH5α fueron seleccionadas por su perfil de resistencia a tetraciclina (Tc), y se purificaron los plásmidos. Posteriormente se movilizó aproximadamente 1 µg de cada plásmido a

las diferentes cepas de *P. aeruginosa* PAO1 (Tabla MS2) —mediante el método de electroporación, previamente reportado [76]. Las clonas se seleccionaron en medios diferenciales, y finalmente se comprobó su integración al cromosoma por reacciones de PCR, utilizando un oligonucleótido delantero específico (Fw) que reconoce la región de cada promotor clonado y un oligonucleótido reverso (LuxRv) que reconoce el gen *luxC* del plásmido mini-CTX-lux.

4.4. Ensayos de luminiscencia

A partir de pre-cultivos de las clonas seleccionadas se prepararon diluciones para obtener una densidad celular inicial $D.O_{.600} = 0.05$ en 15 ml de medio no-permisivo (LB) y/o medio inductor (LB + 5mM EGTA + 20mM $MgCl_2$), los cuales se incubaron hasta alcanzar la densidad celular final correspondiente a fase logarítmica tardía ($D.O_{.600} = 0.8$) o fase estacionaria ($D.O_{.600} = 2.0$), según corresponda. Para cada ensayo biológico se tomaron 200 μ L de cada cultivo a la densidad celular deseada y se depositaron, por triplicado, en placas de poliestireno de 96 pocillos con fondo transparente (*Corning incorporated*®). La luminiscencia producida se cuantificó utilizando el lector Synergy HT Plate Reader (*Biotek*®) [55, 62, 63]. Se determinó la relación de unidades relativas de luminiscencia sobre el valor de la $D.O_{.600}$ al momento de la toma de las células (U.R.L/D.O.). Los resultados representan el promedio de tres ensayos biológicos \pm desviación estándar.

4.5. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas *t-student* utilizando el programa estadístico Graph Prism 6.0® (*Graph-Pad Software, Inc., La Jolla, CA*). Utilizando un 95% de confianza con un valor significancia $P=0.05$, los datos con diferencia significativa tienen un valor de $P<0.05$ y se representan en las gráficas con asteriscos: $P<0.05$ (*); $P<0.01$ (**); $P<0.001$ (***) y $P<0.0001$ (****).

4.6. Ensayos de producción de efectores por el SST3

A partir de pre-cultivos de las cepas seleccionadas se prepararon diluciones para obtener una densidad celular inicial ($D.O_{.600} = 0.05$) en 15 ml de medio inductor, que se incubaron durante 3-4 h a 37 ° C y 225 rpm, hasta alcanzar la densidad celular final correspondiente a fase logarítmica tardía ($D.O_{.600} = 0.8$). Posteriormente, se tomó 1 ml del cultivo y se centrifugó a 4 ° C ($19,750 \times g$, 2 min) para obtener la pastilla celular, la cual se resuspendió con 200 μ L de amortiguador de carga SDS-PAGE normalizado con el valor de la densidad celular al momento de la toma de la muestra. Posteriormente, las muestras fueron desnaturalizadas a 95°C durante 5 minutos. Para la separación de proteínas se utilizaron 7 μ l de cada muestra que se depositaron en los pocillos de geles SDS-PAGE al 12%, siguiendo los protocolos de *Bio-rad* ®. Después de la separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 μ m durante 12 h a 4 ° C. El bloqueo de la membrana se realizó con amortiguador salino Tris pH=7.4 suplementado con detergente Tween-20 al 0.1 % (TBS-T) durante 2 h a 4 ° C con agitación. La membrana bloqueada fue lavada durante 15 minutos con 15 ml de TBS-T, tres veces. Posteriormente, se añadió el anticuerpo primario anti-ExoS diluido 1:2,000 en TBS-T y se incubó durante 1 h a 4 ° C. El anticuerpo policlonal anti-ExoS fue producido por el grupo de trabajo de la D. en C. Bertha González Pedrajo, y permite la identificación de los péptidos de las exotoxinas ExoS y ExoT, debido a su alto nivel de similitud [69]. La membrana se lavó tres veces con TBS-T y se añadió el anticuerpo secundario comercial anti-IgG-GAR (*Jackson ImmunoResearch*®) diluido 1:20,000 en TBS-T y se incubó durante 1 h a 4 ° C con agitación. Finalmente, la membrana se lavó tres veces con TBS-T y se añadió el sustrato quimioluminiscente HRP del kit comercial *Immobilon Western* (*Millipore*®). Las bandas se revelaron en una película de rayos X (*Carestream MXB-Blue film*®).

Para el control de carga, la misma membrana se lavó con 15 ml del *Stripping buffer* (glicina 25 mM, SDS 1%, pH=2.0) durante 1 h a 4 ° C con agitación. Posteriormente, se lavó tres veces con 15 ml de TBS-T hasta remover el amortiguador. La membrana fue bloqueada nuevamente y se incubó durante 12 h a 4°C para después lavar con

TBS-T e incubar con anti-GroEL 1:2,000 (*Sigma*®). Después se lavó con TBS-T y se incubó con anti-IgG-GAR diluido 1:20,000. Finalmente se reveló cómo anteriormente se describió.

Para determinar de manera descriptiva la distribución e intensidad de las bandas obtenidas en los análisis de *Western Blot* se utilizó el programa ImageJ (*National Institutes of Health*®), se determinó el área relativa de cada una de las bandas y se reportó con base en el valor normalizado de acuerdo al control de carga y el control positivo de cada gel.

4.7. Construcción del plásmido pExsA (*exsA*⁺⁺⁺)

A partir de DNA genómico de la cepa PAO1, se amplificó el gen estructural correspondiente al regulador transcripcional *exsA* utilizando los oligonucleótidos ExsA_Fw y ExsA_Rv (Tabla MS2). La banda correspondiente se purificó y clonó entre los sitios BamHI-HindIII del plásmido pUCP20. Después de la movilización, propagación y selección en la cepa *E. coli* DH5 α , el plásmido —llamado pExsA— se purificó y se realizó un ensayo de restricción con las endonucleasas BamHI-HindIII y el buffer 2.1 en un volumen final de 20 μ l para confirmar la liberación del fragmento de 975 pb; adicionalmente se comprobó la integridad de la región clonada, sin cambios en su secuencia (no mostrado). Después, 1 μ g del plásmido pExsA se introdujo por electroporación a la cepa PAO1 Δ *rhIR* y derivadas. Finalmente se seleccionaron las clonas que aceptaron el plásmido, en medios diferenciales, y se comprobó la presencia del plásmido mediante PCR.

4.8. Generación de mutantes por delección

La construcción de las mutantes se realizó con base en el protocolo previamente reportado [77] con mínimas modificaciones. Brevemente, la delección del gen *lasR* se logró utilizando el plásmido pXLRApS, previamente construido [80], para el cual se amplificó 487 pb hacia arriba y 644 pb hacia abajo del gen estructural de *lasR*; mientras que el marcador de apramicina se obtuvo del plásmido pIJ773. Los tres amplificados se utilizaron para realizar un PCR de tres piezas, el producto

obtenido fue digerido con HindIII, purificado y clonado en el sitio HindIII del plásmido pEX18ApGW, para obtener el plásmido pXLRApS. Este plásmido fue movilizado a la cepa receptora PAO1 silvestre para reemplazar al gen *lasR* por el marcador de resistencia a apramicina —mediante doble intercambio alélico— y de esta manera obtener la mutante sencilla *lasR* (Δ *lasR*-Ap). El mismo plásmido (pXLRApS) fue movilizado a la cepa receptora PAO1 Δ *rhIR*, previamente construida [17], para obtener la doble mutante (Δ *lasR*-Ap / Δ *rhIR*). En cada caso las clonas candidatas fueron seleccionadas en medios diferenciales con los respectivos antibióticos y la presencia de los marcadores de resistencia fue confirmado por PCR y secuenciación de la región modificada.

4.9. Extracción de autoinductores

Los pre-cultivos de las cepas de *P. aeruginosa*, fueron utilizados para inocular 15 ml del medio líquido PPGAS [78] sin antibióticos y obtener una densidad celular inicial ($D.O_{600}=0.05$) que se incubaron durante 24 h a 37 °C y 225 rpm. Después, el cultivo fue centrifugado a 4 °C (16,000 x g, 10 min) y se colectó el sobrenadante en tubos de polipropileno. Posteriormente, una muestra de 10 ml del sobrenadante se extrajo dos veces con volúmenes iguales de acetato de etilo acidificado que fueron agitados vigorosamente durante 15 min, y después se centrifugaron a 4 °C (8,000 x g, 10 min). La fase superior se colocó en un tubo seco de polipropileno y se dejó secar hasta que se evaporó el disolvente. Los residuos secos en tubos de microcentrífuga se preservaron a -20°C hasta su uso, para lo cual fueron reconstituidos con 50 μ l de metanol grado biología molecular [17].

4.10. Ensayo para cuantificar la producción de C₁₂

Para comprobar la funcionalidad del regulador transcripcional LasR, se realizaron bioensayos en sistemas heterólogos. Para ello, se utilizaron pre-cultivos de la cepa *E. coli* DH5 α y el plásmido pECP64, el cual contiene la fusión traduccional *lasB*'-*lacZ*; y expresa al gen *lasR* bajo el promotor *plac* [14]. Se inocularon 15 ml de LB sin antibióticos con el volumen de pre-cultivo necesario para alcanzar una

D.O.₆₀₀=0.05, a estos cultivos se añadieron 30 μ L de los autoinductores, previamente extraídos de las cepas a evaluar. Se utilizaron metanol grado biología molecular y C₁₂ sintético a una concentración final de 10 μ M como controles negativo y positivo, respectivamente. Los cultivos fueron incubados hasta alcanzar la fase estacionaria (D.O.₆₀₀= 2.0), posteriormente se tomaron alícuotas de 1ml de cada cultivo y se centrifugaron a 4°C (16, 000 x g, 2 min), la pastilla celular se secó y se utilizó para cuantificar la actividad β -galactosidasa como se describió previamente [79].

CAPÍTULO V.- RESULTADOS

5.1. Evaluación del sistema de expresión

5.1.1 Construcción de fusiones transcripcionales pC-lux y pP-lux

Con el objetivo de evaluar el efecto que ejerce los sistemas de QS sobre la expresión de genes representativos del SST3, se utilizaron las fusiones transcripcionales previamente construidas pA-lux, pS-lux y pT-lux, las cuales incluyen las regiones reguladoras de los genes *exsA*, *exoS* y *exoT*, respectivamente; así como el control negativo 2 (plásmido pX₂) [80] (Figura 10a). No obstante, como parte integral del SST3 decidimos evaluar la expresión del principal operón regulador *exsCEBA* y el gen *spcS*; que codifica para la chaperona SpcS y es necesaria para la secreción de las exotoxinas S y T [49]. Las regiones reguladoras de estos genes fueron clonadas como se mencionó en materiales y métodos, para obtener las fusiones transcripcionales pC-lux (*exsCEBA*) y pP-lux (*spcS*). Su integridad se comprobó por ensayos de restricción (Figura 10b) y secuenciación de la región clonada (no mostrado).

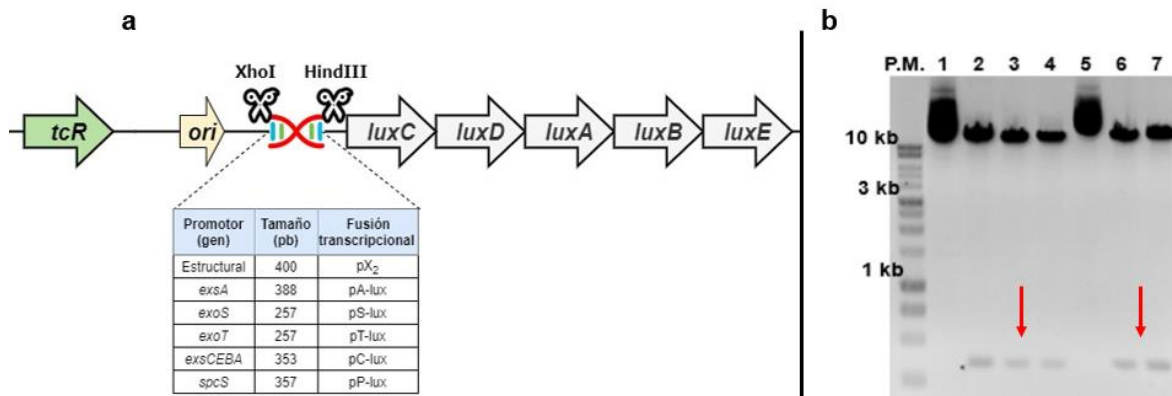


Figura 10.- Fusiones transcripcionales. a)- Las regiones promotoras mostradas se amplificaron del ADN genómico de la cepa PAO1 y se clonaron entre los sitios XhoI y HindIII del vector mini-CTX-lux. **b).** -Ensayo de restricción utilizando las enzimas XhoI y HindIII, la flecha roja indica la liberación de los fragmentos en gel de agarosa: 1) plásmido pP-lux sin digerir; 2-4) digestión del plásmido pP-lux purificado de 3 clonas (357 pb); 5) plásmido pC-lux sin digerir; 6-7) digestión del plásmido pC-lux purificado de 2 clonas (353 pb).

5.1.2. Comprobación de la integración cromosomal de las fusiones

Los plásmidos pA-lux (*exsA*), pS-lux (*exoS*), pT-lux (*exoT*), pC-lux (*exsCEBA*), pP-lux (*spcS*) y pX₂ (control negativo de luminiscencia) fueron insertados por electroporación a la cepa PAO1 silvestre, la cepa $\Delta rhIR$, y las cepas complementadas $\Delta rhIR$ -pGMYC (*rhIR*⁺⁺⁺) y $\Delta rhIR$ -pUCP20 (plásmido vacío). La integración cromosomal de las fusiones transcripcionales mencionadas, fue confirmada por reacciones de PCR utilizando un oligonucleótido directo que reconoce la cada promotor clonado y un oligonucleótido reverso que reconoce el gen *luxC* (Figura 11). DE esta manera se obtuvieron las cepas silvestres PAO1-pX, PAO1-pA-lux, PAO1-pS-lux, PAO1-pT-lux, PAO1-pC-lux, PAO1-pP-lux, como controles positivos; las cepas mutantes $\Delta rhIR$ -pA-lux, $\Delta rhIR$ -pS-lux, $\Delta rhIR$ -pS-lux, $\Delta rhIR$ -pC-lux, $\Delta rhIR$ -pP-lux, y sus derivadas complementadas (Tabla MS1).

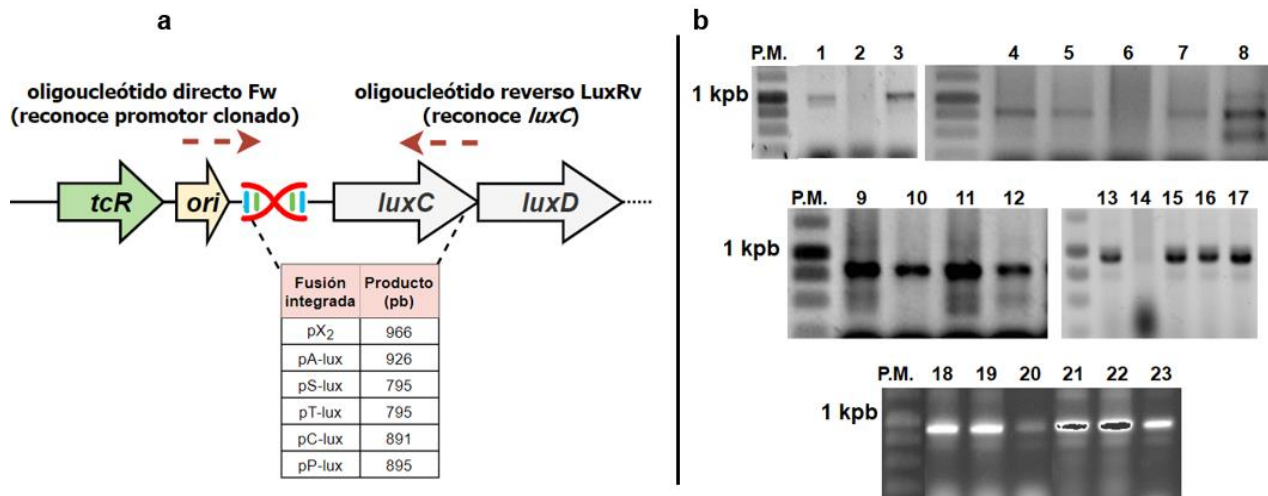


Figura 11.- Comprobación de la integración cromosomal de las fusiones transcripcionales. a). - Para las reacciones de PCR se utilizó un oligonucleótido directo que reconoce la región promotora de cada promotor clonado y un oligonucleótido reverso que reconoce el gen *luxC*. b) .- Identificación de productos de PCR en geles de agarosa: 1) PAO1-pX₂; 2) control negativo de reacción de PCR; 3) $\Delta rhIR$ -pX₂; 4) PAO1-pT-lux; 5) $\Delta rhIR$ -pT-lux; 6) control negativo de reacción de PCR; 7) $\Delta rhIR$ -pT-lux-pGMYC; 8) $\Delta rhIR$ -pT-lux-pUCP20; 9) PAO1-pS-lux; 10) $\Delta rhIR$ -pS-lux; 11) $\Delta rhIR$ -pS-lux-pGMYC; 12) $\Delta rhIR$ -pS-lux-pUCP20; 13) PAO1-pA-lux; 14) control negativo de reacción de PCR; 15) $\Delta rhIR$ -pA-lux; 16) $\Delta rhIR$ -pA-lux-pGMYC; 17) $\Delta rhIR$ -pA-lux-pUCP20; 18) PAO1-pC-lux; 19) $\Delta rhIR$ -pC-lux; 20) $\Delta rhIR$ -pC-lux-pGMYC; 21) PAO1-pP-lux; 22) $\Delta rhIR$ -pP-lux; 23) $\Delta rhIR$ -pP-lux-pGMYC. Condiciones de PCR tabla MS2.

5.1.3. Cuantificación de la actividad de las fusiones en inducción

Para evaluar las condiciones de inducción del SST3 utilizadas en este proyecto, inicialmente se cuantificó la expresión de las fusiones transcripcionales en la cepa PAO1 silvestre (controles positivos) durante la fase logarítmica tardía en micro-cultivo. El medio LB fue considerado como medio no-permisivo; mientras que el medio inductor consiste en medio LB suplementado con EGTA 5 mM y MgCl₂ 20 mM. Este ensayo preliminar se realizó al añadir, por triplicado, 200 µL del cultivo a una densidad celular inicial de D.O.₆₀₀= 0.05 directamente en los pocillos de placas de poliuretano. Las placas se incubaron en el lector de luminiscencia a 37 °C sin agitación, hasta alcanzar una D.O.₆₀₀= 0.4. En estas condiciones, el crecimiento de la bacteria es limitado por lo cual este valor de D.O.₆₀₀ corresponde a la fase logarítmica tardía en pocillo.

Como se observa en la figura 12, la actividad basal del plásmido mini-CTX-lux (pX), utilizado inicialmente como control negativo, es independiente de la concentración de calcio, debido a que sus niveles de expresión no cambian en ambas condiciones. Por otro lado, la fusión pA-lux (*exsA*) se activa débilmente con respecto al valor basal de pX, pero su actividad se mantiene sin cambios tanto en medio no-permisivo como en medio inductor. Lo anterior confirma que la actividad de *exsA* —a partir de su promotor interno— es independiente de la concentración de calcio presente en el medio de cultivo, como se había descrito previamente [67]. Sin embargo, la expresión de pC-lux, que corresponde al promotor del operón regulador *exsCEBA*, incrementó al menos 3 veces en condiciones de inducción con respecto al medio no-permisivo, lo mismo sucede para la actividad de las fusiones pS-lux (*exoS*) y pT-lux (*exoT*) y pP-lux (*spcS*) en condiciones de micro-cultivo (Figura 12). Estos resultados demuestran que las fusiones transcripcionales pC-lux, pS-lux, pP-lux y pT-lux se activan en las condiciones propuestas y permitirán evaluar el efecto que ejercen los sistemas de QS sobre su expresión (Tabla 4).

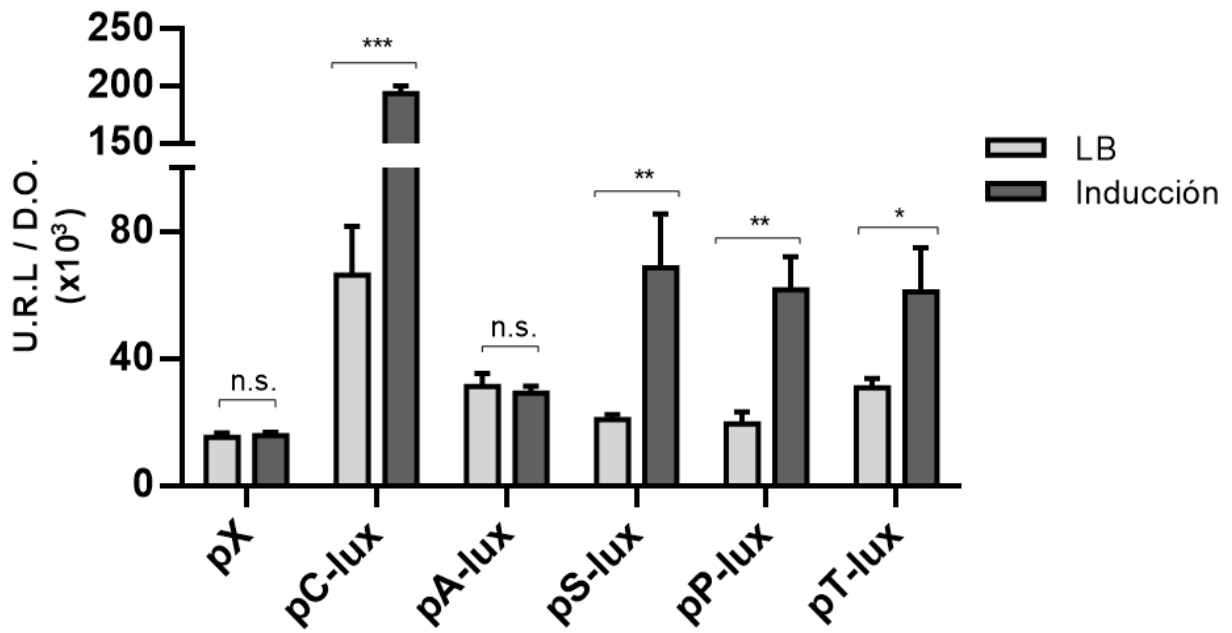


Figura 12.- Actividad de las fusiones transcripcionales en inducción. La expresión de genes representativos del SST3 se activa en condiciones de inducción (LB+EGTA 5 mM+MgCl₂ 20 mM) con respecto a las condiciones no-permisivas (LB). Cada replica biológica se realizó al añadir, por triplicado, 200 μ L de cultivo a una densidad celular inicial de D.O.₆₀₀=0.05 directamente en los pocillos de la placa de poliestireno con fondo transparente, que se incubaron a 37 °C sin agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀=0.4; en estas condiciones de micro-cultivo este valor de densidad celular corresponde a la fase logarítmica tardía. pX (mini-CTX-lux), pC-lux (*exsCEBA*), pA-lux (*exsA*), pS-lux (*exoS*), pP-lux (*spcS*) y pT-lux (*exoT*). Se muestra el promedio de 3 réplicas biológicas \pm desviación estándar. Diferencia significativa *t-student*: (*, P<0.05); (**, P<0.01); (***, P<0.001); n.s.= no significativo.

Fusión transcripcional (promotor)	PAO1 silvestre (x10 ³)	
	LB	Inducción
pC-lux (<i>exsCEBA</i>)	66.4 \pm 15.3	193.7 \pm 6.5
pA-lux (<i>exsA</i>)	31.3 \pm 4.0	29.2 \pm 2.2
pS-lux (<i>exoS</i>)	20.9 \pm 1.6	68.6 \pm 17.1
pP-lux (<i>spcS</i>)	19.4 \pm 3.8	61.8 \pm 10.4
pT-lux (<i>exoT</i>)	30.8 \pm 3.0	61.1 \pm 13.9

En condiciones de micro-cultivo el valor de la actividad del control negativo pX (mini-CTX-lux) es menor a 16.0 x10³. Plásmidos: pC-lux (*exsCEBA*), pA-lux (*exsA*), pS-lux (*exoS*), pP-lux (*spcS*) y pT-lux (*exoT*). Cada replica biológica se realizó al añadir, por triplicado, 200 μ l de cultivo a una D.O.₆₀₀ = 0.05 directamente en los pocillos de las placas de poliestireno que se incubaron en el lector a 37 °C sin agitación, hasta alcanzar la fase logarítmica tardía, que en estas condiciones de micro-cultivo corresponde a D.O.₆₀₀= 0.4. Se muestra el promedio de 3 réplicas biológicas \pm desviación estándar.

En estas condiciones de micro-cultivo observamos que el crecimiento de la bacteria esta reducido, ya que la fase logarítmica tardía corresponde a $D.O_{.600} = 0.4$ y la fase estacionaria a $D.O_{.600} = 1.0$. Por lo cual decidimos modificar las condiciones para posteriores análisis; es decir dejamos de incubar las muestras directamente en el lector y decidimos incubar por separado las cepas en 15 ml de medio de cultivo a 37 °C con agitación constante, ya que mejora su crecimiento y las cepas alcanzan la fase logarítmica tardía aproximadamente a una $D.O_{.600} = 0.8$ y la fase estacionaria a $D.O_{.600} = 2.0$ como se ha reportado previamente [30]. De esta manera el lector solo sería utilizado para determinar las unidades relativas de luminiscencia (U.R.L.) de 200 μ l de cultivo tomados a la densidad celular deseada, la cual fue determinada por espectrofotometría a 600nm.

Adicionalmente, desde los primeros ensayos de inducción utilizando al control negativo mini-CTX-lux (pX) observamos que su actividad basal era de aproximadamente 16.0×10^3 U.R.L./D.O. (Tabla 4); por lo cual, fue reemplazado por el plásmido pX₂, el cual contiene una región no codificante de 400 pb clonada entre los sitios XhoI y HindIII del vector mini-CTX-lux [80]. El plásmido pX₂, se movilizó a la cepa PAO1 silvestre y se comprobó su integración cromosomal mediante PCR, generando la cepa PAO1-pX₂ (Figura 11), posteriormente se cuantificó su expresión en 15 ml de medio inductor a 37 °C y 225 rpm durante la fase logarítmica tardía, con un valor menor a 5.0×10^3 U.R.L./D.O. y menor a 3.0×10^3 U.R.L./D.O., durante la fase estacionaria, por lo cual fue utilizado como control negativo de luminiscencia para los siguientes ensayos de expresión. El valor del control negativo pX₂ se representa en las gráficas por una línea roja punteada.

5.2. Efecto del sistema Rhl en la expresión del SST3

5.2.1. Efecto de la inactivación del gen *rhlR* en la expresión de genes del SST3 durante la fase logarítmica tardía

Después de establecer las condiciones para los ensayos de expresión, decidimos evaluar el efecto de la inactivación del gen del regulador transcripcional

RhIR (cepa $\Delta rhIR$) en la expresión de las fusiones transcripcionales durante la fase logarítmica tardía. Los resultados de la figura 13 demuestran que la inactivación del gen *rhIR* disminuye significativamente la expresión de las fusiones transcripcionales pS-lux (*exoS*) y pP-lux (*spcS*), mientras que la actividad de la fusión transcripcional pC-lux, que corresponde a la actividad del operón regulador del SST3 (*exsCEBA*) reduce 90% su expresión en la cepa $\Delta rhIR$.

Sin embargo, la fusión transcripcional pA-lux (*exsA*), cuya actividad no responde a las condiciones de inducción, tampoco se afecta en la cepa $\Delta rhIR$ (no mostrado), y el efecto en la expresión de pT-lux (*exoT*) no es significativo con respecto a la cepa silvestre. La actividad de las fusiones transcripcionales afectadas se recupera prácticamente a niveles silvestres después de *trans*-complementar con el gen *rhIR* constitutivo (plásmido pGMYC), sin efecto del vector vacío (plásmido pUCP20). Los resultados sugieren que, a diferencia de lo reportado previamente, RhIR es un regulador positivo del SST3, ya que su inactivación afecta la expresión de los genes *exoS*, *spcS*, y del operón *exsCEBA*.

5.2.2. Efecto de la sobre-expresión de ExsA en la cepa $\Delta rhIR$

Los resultados anteriores sugieren que RhIR podría afectar: 1) selectivamente a cada promotor de los genes evaluados; 2) directamente la expresión del regulador maestro ExsA que se transcribe como parte de un ARNm policistrónico que proviene del operón *exsCEBA*. Por lo cual, considerando que el promotor interno *exsA* (pA-lux) no se afecta por la inactivación de *rhIR*, pero la actividad del promotor del operón *exsCEBA* (pC-lux) disminuye 90% en la cepa $\Delta rhIR$ comparada con la cepa silvestre, nos enfocamos en la hipótesis de que RhIR regula la expresión de *exsA* al alterar la actividad del promotor del operón *exsCEBA*. Para comprobarlo decidimos sobre-expresar al regulador ExsA, desde un promotor constitutivo e independiente en la cepa $\Delta rhIR$, y verificar la actividad de las fusiones transcripcionales. Para ello se utilizó el plásmido pExsA (*exsA⁺⁺*), que fue construido para este proyecto como se menciona en materiales y métodos y se resume en la figura MS1.

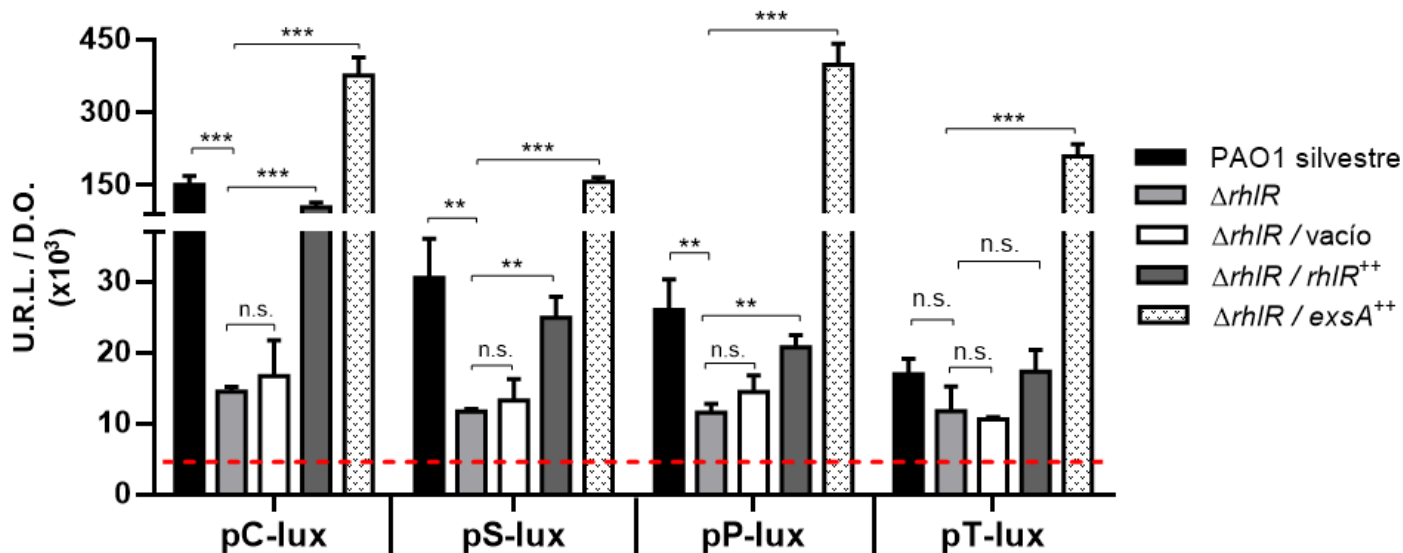


Figura 13.- Efecto de la inactivación de *rhIR* y la sobre-expresión de *exsA* durante la fase logarítmica tardía. La delección del gen *rhIR* disminuye la expresión de todas las fusiones transcripcionales, excepto pT-lux. La actividad se recupera al *trans*-complementar con *rhIR* constitutivo. Adicionalmente, la expresión de todas las fusiones incrementa al sobre-expresar a *exsA* constitutivo, a pesar de la inactivación del gen *rhIR*. Cada replica biológica se realizó al evaluar, por triplicado, 200 μ L de cultivo a una D.O.₆₀₀=0.8 (fase logarítmica tardía) obtenidos de 15 ml de medio inductor incubados a 37 °C y 225 rpm. Plásmidos: pC-lux (*exsCEBA*), pS-lux (*exoS*), pP-lux (*spcS*) y pT-lux (*exoT*), pExsA (*exsA*⁺⁺), pGMYC (*rhIR*⁺⁺), pUCP20 (plásmido vacío). La línea punteada-roja corresponde al valor de la cepa PAO1-pX₂, utilizado como control negativo de luminiscencia. Se muestra el promedio de 3 réplicas biológicas \pm desviación estándar. Diferencia significativa *t*-student: (*, P<0.05); (**, P<0.01); (***, P<0.001); n.s.= no significativo.

Tabla 5.- Efecto de la inactivación de *rhIR* y la sobre-expresión de *exsA* en la actividad transcripcional de genes representativos del SST3 durante la fase logarítmica tardía

Fusión transcripcional (promotor)	PAO1 silvestre (x10 ³)	$\Delta rhIR$ (x10 ³)	$\Delta rhIR$ /vacío (x10 ³)	$\Delta rhIR$ / $rhIR^{++}$ (x10 ³)	$\Delta rhIR$ / $exsA^{++}$ (x10 ³)
pC-lux (<i>exsCEBA</i>)	150.3±18.7	14.5±0.7	16.7±5.1	104.2±10.0	376.5±37.5
pS-lux (<i>exoS</i>)	30.5±5.5	11.7±0.3	13.2±3.0	25.0±3.0	156.5±9.6
pP-lux (<i>spcS</i>)	26.0±4.3	11.5±1.3	14.4±2.3	20.7±1.7	398.8±43.0
pT-lux (<i>exoT</i>)	16.9± 2.1	11.7±3.5	10.6±0.3	17.3±3.0	209.3±25.2

El valor de la actividad del control negativo pX₂ es menor a 5.0 x10³ en fase logarítmica tardía (D.O.₆₀₀= 0.8). Plásmidos: pC-lux (*exsCEBA*), pA-lux (*exsA*), pS-lux (*exoS*), pP-lux (*spcS*) y pT-lux (*exoT*). Cada replica biológica se realizó evaluando, por triplicado, 200 μ l, de muestra obtenida a partir del cultivo de 15 ml en medio inductor incubado a 37 °C y 225 rpm. Se muestra el promedio de 3 réplicas biológicas \pm desviación estándar.

Los resultados de la figura 13 indican que la sobre-expresión de *exsA* en la cepa $\Delta rhIR$, incrementa la actividad de todas las fusiones transcripcionales comparadas con la cepa silvestre. Es decir, la actividad de los promotores *exsCEBA*, *exoS*, *spcS* y *exoT* incrementan su expresión 2, 6, 16 y 12 veces respectivamente, a pesar de la inactivación de *rhIR* (Tabla 5).

En este sentido, los resultados sugieren que RhIR regula de manera positiva la expresión del operón *exsCEBA*, lo cual permite la transcripción de *exsA* como último elemento del operón, el cual a su vez se traduce a la proteína ExsA para activar a los demás genes del SST3 con distintos niveles de activación según su afinidad por ExsA. De esta manera es menos probable que, durante la fase exponencial tardía, RhIR regule diferencialmente a cada uno de los genes del SST3. Estos datos nos permiten proponer la cascada de regulación: RhIR \rightarrow *exsCEBA* \rightarrow SST3.

5.2.3. Efecto de la inactivación de *rhIR* y la sobre-expresión de ExsA en la producción de exotoxinas.

Con la finalidad de evaluar si el efecto observado a nivel transcripcional se reflejaba en la cantidad de proteína, realizamos un perfil de producción de las exotoxinas ExoS y ExoT, en la cepa $\Delta rhIR$ y la cepa $\Delta rhIR$ -pExsA. Los ensayos de producción de exotoxinas se realizaron en las mismas condiciones de crecimiento e inducción utilizadas durante la evaluación de la actividad de las fusiones transcripcionales. La identificación de ExoS y ExoT se realizó con el anticuerpo policlonal anti-ExoS, el cual permite identificar ambos polipéptidos por su alto nivel de identidad [69]. Como control negativo en la producción de exotoxinas se utilizó la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 9027, una mutante natural del SST3 (Figura MS2) [78].

Los resultados de la figura 14, confirman lo observado a nivel transcripcional, ya que la inactivación del gen *rhIR* abate la producción de las exotoxinas, y se restaura a niveles similares de la cepa silvestre, después de *trans*-complementar con *rhIR* constitutivo (*rhIR*⁺⁺); de igual manera la sobre-expresión de ExsA (*exsA*⁺⁺) tiene

como efecto la sobre-producción de exotoxinas en la cepa $\Delta rhIR$. De esta manera se fortalece la hipótesis en la cual el regulador transcripcional RhIR favorece la expresión de ExsA durante la fase logarítmica tardía.

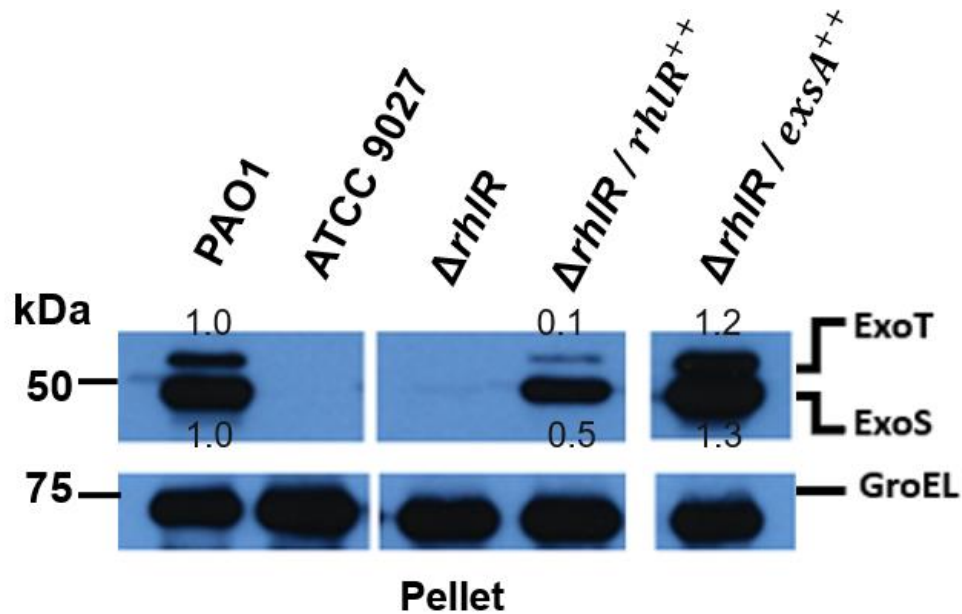


Figura 14.- Efecto de la inactivación de *rhIR* y la sobre-expresión de *exsA* en la producción de exotoxinas. La inactivación de *rhIR* abate la producción de las exotoxinas S y T, lo cual se revierte parcialmente al complementar con *rhIR* bajo un promotor constitutivo (*rhIR*⁺⁺), mientras que la expresión constitutiva de ExsA (*exsA*⁺⁺) sobre-produce exotoxinas a pesar la inactivación de *rhIR*. PAO1 (control positivo), ATCC9027 (control negativo). La pastilla celular (pellet) fue obtenida de la toma de 1 ml de cultivo en medio inductor a D.O.₆₀₀=0.8. Se utilizó el suero diluido del anticuerpo policlonal anti-ExoS para la identificación de los polipéptidos ExoS y ExoT por su alto nivel de identidad. Como control de carga se utilizó el anticuerpo comercial anti-GroEL (Sigma®). La abundancia relativa de las bandas fue analizada con ImageJ®.

5.2.4. Efecto de la inactivación de *rhIR* y la sobre-expresión de *exsA* en la expresión de genes del SST3 durante la fase estacionaria

El siguiente objetivo fue evaluar si el efecto observado en la fase logarítmica tardía, se mantenía durante la fase estacionaria por lo cual decidimos evaluar el efecto de la inactivación de *rhIR* en la actividad de genes representativos del SST3 a una D.O.₆₀₀ = 2.0, cuando los sistemas de QS están completamente activos [11, 30]. Los resultados de la figura 15 nos permiten confirmar que, durante la fase estacionaria se mantiene el efecto de la inactivación del gen *rhIR* sobre la expresión de pC-lux (*exsCEBA*); es decir su actividad disminuye un 63% con respecto a los valores de la cepa silvestre, pesar de que en general disminuye la actividad de todo el sistema de expresión. Por otro lado, a pesar de que la inactivación de *rhIR*, parece favorecer la expresión de *exoS* y *exoT* en fase estacionaria; esta reducción no es significativa (Tabla 6). Es decir, las fusiones pS-lux, pT-lux, pP-lux, muestran una expresión similar a las condiciones de no inducción (Figura 12), lo cual indica que el sistema se encuentra apagado. Además, la sobre-expresión de ExsA en la cepa $\Delta rhIR$ aumenta la actividad de las fusiones transcripcionales evaluadas en la fase estacionaria, similar a lo que sucede en la fase logarítmica tardía, indicando que el blanco de regulación de RhIR es la expresión de *exsA*, como último elemento del operón *exsCEBA*. Por lo cual, controlar los niveles del regulador maestro del SST3, permitiría tener el control de prácticamente todo el SST3. Sin embargo, será necesario realizar un perfil de producción de exotoxinas durante la fase estacionaria, para confirmar que el efecto positivo de RhIR, sobre la expresión de *exsCEBA*, se mantiene en la fase estacionaria.

La regulación transcripcional positiva de RhIR sobre el SST3 es congruente, ya que conforme la bacteria crece, se va preparando para establecerse e infectar para lo cual la activación coordinada del SST3, junto con otros factores de virulencia QS-regulados, es importante para el éxito de la infección.

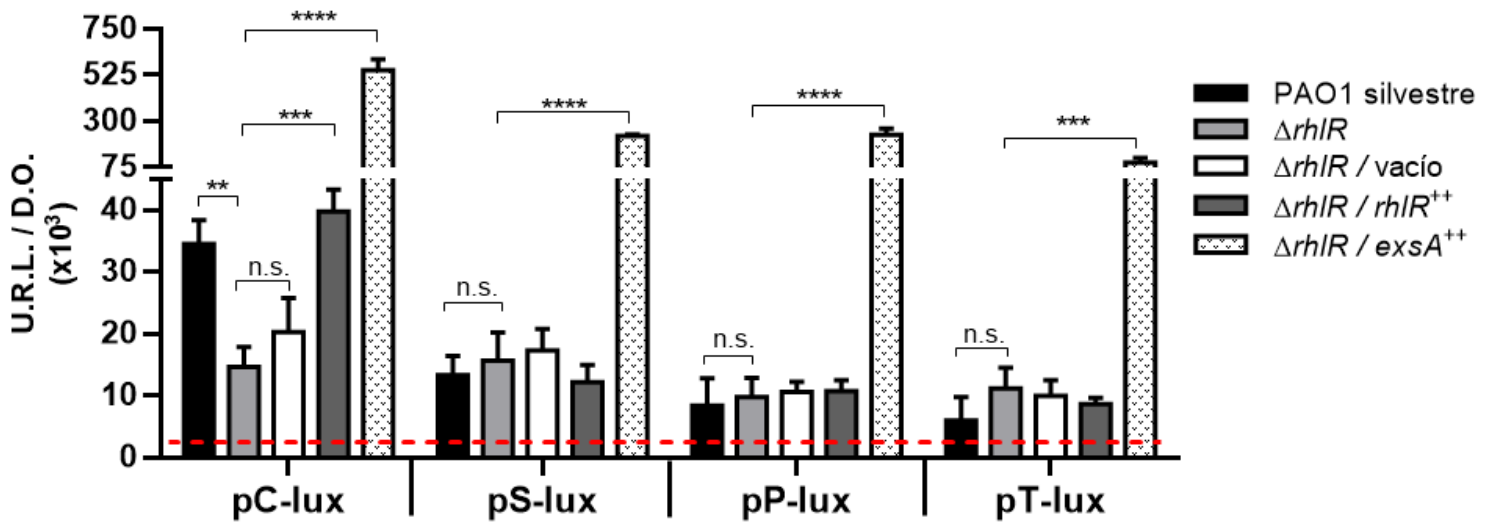


Figura 15.- Efecto de la inactivación de *rhIR* y la sobre-expresión de *exsA* durante la fase estacionaria. La actividad transcripcional del SST3 de la cepa PAO1 disminuye en fase estacionaria a pesar de la inducción. Sin embargo, la inactivación de *rhIR* disminuye la expresión de pC-lux y se recupera al complementar con *rhIR* constitutivo. Mientras que la expresión de todas las fusiones transcripcionales incrementa al *trans*-complementar con *exsA* constitutivo, a pesar de la inactivación del gen *rhIR*. Cada replica biológica se realizó al evaluar, por triplicado, 200 μ L de cultivo a una D.O.₆₀₀ = 2.0 (fase estacionaria) obtenidos de 15 ml de medio inductor incubados a 37 °C y 225 rpm. Plásmidos: pC-lux (*exsCEBA*), pS-lux (*exoS*), pP-lux (*spcS*) y pT-lux (*exoT*), pExsA (*exsA⁺⁺*), pGMYC (*rhIR⁺⁺*), pUCP20 (plásmido vacío). La línea punteada-roja corresponde al valor de la cepa PAO1-pX₂, utilizado como control negativo de luminiscencia. Se muestra el promedio de 3 réplicas biológicas \pm desviación estándar. Diferencia significativa *t*-student: (*, P<0.05); (**, P<0.01); (***, P<0.001); n.s.= no significativo.

Tabla 6.- Efecto de la inactivación de *rhIR* y la sobre-expresión de *exsA* en la actividad transcripcional de genes representativos del SST3 durante la fase estacionaria

Fusión transcripcional (promotor)	PAO1 silvestre (x10 ³)	$\Delta rhIR$ (x10 ³)	$\Delta rhIR$ /vacío (x10 ³)	$\Delta rhIR$ / $rhIR^{++}$ (x10 ³)	$\Delta rhIR$ / $exsA^{++}$ (x10 ³)
pC-lux (<i>exsCEBA</i>)	34.5±3.8	14.6±3.3	20.3±5.6	39.8±3.5	548.1±54.3
pS-lux (<i>exoS</i>)	13.3±3.1	15.7±4.5	17.3±3.5	12.2±2.8	228.2±8.2
pP-lux (<i>spcS</i>)	8.4±4.4	9.8±3.1	10.6±1.6	10.7±1.8	233.9±31.0
pT-lux (<i>exoT</i>)	6.0±3.7	11.2±3.4	10.0±2.5	8.7±1.0	98.7±22.9

El valor de la actividad del control negativo pX₂ es menor a 3.0 x10³ en fase estacionaria (D.O.₆₀₀ = 2.0). Plásmidos: pC-lux (*exsCEBA*), pS-lux (*exoS*), pP-lux (*spcS*) y pT-lux (*exoT*), pExsA (*exsA⁺⁺*), pGMYC (*rhIR⁺⁺*), pUCP20 (plásmido vacío). Cada replica biológica se realizó evaluando, por triplicado, 200 μ l, de muestra obtenida a partir del cultivo de 15 ml en medio inductor incubado a 37 °C y 225 rpm. Se muestra el promedio de 3 réplicas biológicas \pm desviación estándar.

5.2.5. Efecto de la inactivación de los genes *rhII* y *pqsE* en la producción de exotoxinas

Se ha reportado que la inactivación del gen *rhII* no tiene un fenotipo similar al de $\Delta rhIR$ sobre la virulencia de diversas cepas clínicas [20, 71]. Con el objetivo de evaluar si sucede algo similar en la actividad del SST3, decidimos evaluar cómo se afectaba el perfil de producción de las exotoxinas en una cepa con el gen *rhII* inactivo utilizando la cepa PAO $\Delta rhII$, previamente construida. El gen *rhII* codifica para la sintasa del autoinductor N-butilil-homoserina lactona (C₄) necesario para la activación canónica de RhIR, por lo cual, si el SST3 es controlado por un Rhl canónico, esperaríamos que la inactivación de *rhII* tuviera el mismo efecto que la inactivación de *rhIR*. Sin embargo, los resultados demuestran que la cepa $\Delta rhII$ sigue produciendo exotoxinas a niveles similares que la cepa silvestre (Figura 16).

Lo anterior nos llevó a plantear dos hipótesis: 1) la ausencia de C₄ en la cepa PAO $\Delta rhII$ es restaurada por otro autoinductor que pueda unirse a RhIR, el cual podría ser sintetizado por PqsE [21] y 2) RhIR podría ejercer un efecto sin C₄, similar a cuando afecta la transcripción de los genes *rhIA* y *qscR*, ya que a pesar de que el complejo RhIR-C₄ puede activar su expresión, la unión del regulador RhIR (sin C₄) la reprime [81, 82]. Para comprobar la primera hipótesis, decidimos evaluar el efecto en la producción de exotoxinas en una cepa con el gen *pqsE* inactivo ($\Delta pqsE$), ya que se ha reportado que esta proteína, con actividad de tioesterasa, podría estar involucrada en la producción de otra molécula señalizadora. Sin embargo, los resultados (Figura 16) demuestran que la inactivación de *pqsE*, aparentemente solo afecta la producción de ExoT; aunque el hecho de no identificarlo en los Western Blot, podría deberse a la baja reproducibilidad para su identificación ya que la naturaleza del anticuerpo anti-ExoS permite identificar de manera secundaria a ExoT. De ser así la producción de exotoxinas no se afectaría en este fondo genético, similar a lo que sucede con la cepa PAO $\Delta rhII$.

Lo anterior, sugiere que quizá la ausencia de una proteína se suple por la presencia de la otra, para lo cual proponemos que en posteriores proyectos se determine el efecto de la doble inactivación de los genes que codifican para la sintasa RhII y la tioesterasa PqsE ($\Delta rhII-\Delta pqsE$) y así definir si RhIR necesita de cualquiera de los productos sintetizados por estas proteínas; de no ser así, entonces RhIR podría ejercer su efecto sin autoinductor o depender de la presencia de otra molécula señalizadora que no es sintetizado por RhII ni PqsE.

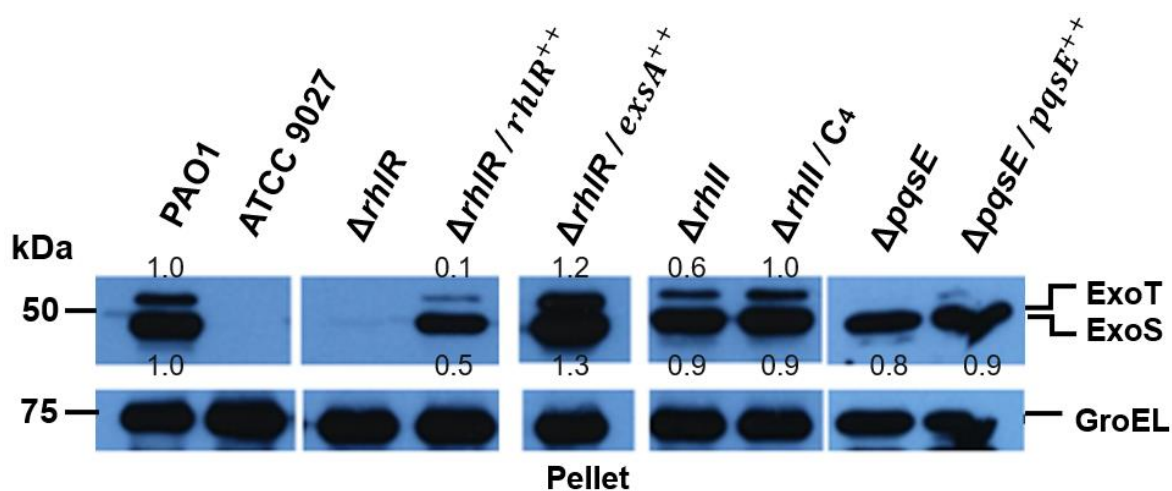


Figura 16.- Efecto de la inactivación de *rhII* y *pqsE* en la producción de exotoxinas. La inactivación de *rhII* o *pqsE* no fenocopian la inactivación de *rhIR* en la producción de exotoxinas S y T. PAO1 (control positivo), ATCC9027 (control negativo). La pastilla celular (pellet) fue obtenida de la toma de 1 ml de cultivo en medio inductor a D.O.₆₀₀=0.8. Se utilizó el suero diluido del anticuerpo policlonal anti-ExoS para la identificación de los polipéptidos ExoS y ExoT por su alto nivel de identidad. Como control de carga se utilizó el anticuerpo comercial anti-GroEL (Sigma®). La abundancia relativa de las bandas fue analizada con ImageJ®.

5.3. Efecto de sistema Las sobre el SST3

5.3.1. Efecto de la inactivación de *lasR* en la actividad *exsCEBA* y *exoS*

La organización jerárquica de los sistemas de QS en la cepa PAO1 indica que el sistema Las activa al sistema Rhl [10, 17]. Por lo tanto, se esperaría que la inactivación de *lasR* tenga un efecto negativo indirecto sobre la expresión del SST3. Para comprobarlo, movilizamos las fusiones transcripcionales pC-lux (*exsCEBA*) y pS-lux (*exoS*) —como genes representativos del SST3— hacia la cepa $\Delta lasR$ -Ap y se comprobó su integración por reacciones de PCR a partir de las colonias seleccionadas que crecieron en medios diferenciales (Figura MS3), generando así las cepas $\Delta lasR$ -Ap-pS-lux y $\Delta lasR$ -Ap-pC-lux (Tabla MS4). Adicionalmente, las fusiones pC-lux y pS-lux fueron movilizadas a las cepas PAO1-pMT1 y PAO1-pUCP20, las cuales contienen los plásmidos pMT1 (que expresa al gen *lasR* desde un promotor constitutivo) y pUCP20 (plásmido vacío), respectivamente. Finalmente se evaluó su expresión en inducción y durante la fase logarítmica tardía.

Como se muestra en la figura 17 y la tabla 7, la fusión transcripcional pC-lux (*exsCEBA*), disminuye 80% su actividad; mientras que la fusión pS-lux (*exoS*) disminuye 63% en la cepa $\Delta lasR$ -Ap. Es decir, la reducción de la actividad de *exsCEBA* en la cepa $\Delta lasR$ -Ap es similar al efecto observado en la cepa $\Delta rhIR$, donde disminuye un 90%. Esto sugiere que la disminución de la actividad de las fusiones evaluadas es secundaria a la disminución de los niveles de RhlR, como consecuencia de la inactivación de *lasR*, lo cual se podría comprobar al expresar a *rhIR* constitutivo en la cepa $\Delta lasR$ -Ap y observar si se recupera la actividad de *exsCEBA* a niveles similares a los de la cepa silvestre. De ser así se demostraría que la jerarquía del sistema Las sobre el sistema Rhl se mantiene en estas condiciones de inducción del SST3. No obstante, estos resultados son preliminares ya que faltaría complementar la inactivación del gen *lasR* en la cepa $\Delta lasR$ -Ap y evaluar la actividad de las fusiones transcripcionales.

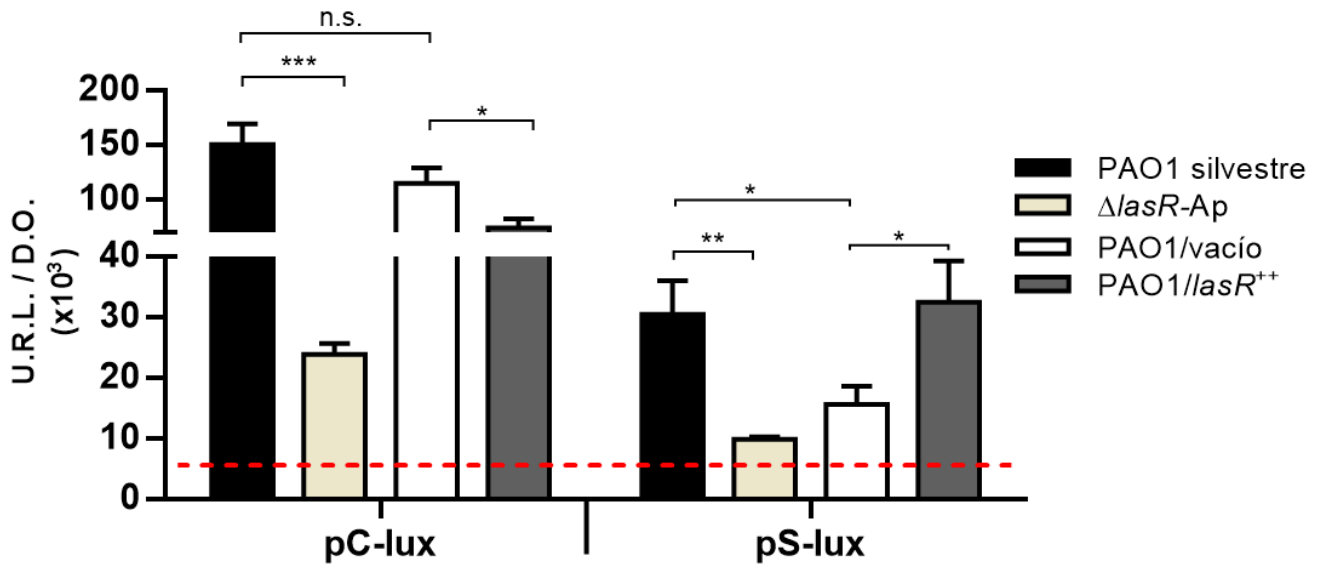


Figura 17.- Efecto de la inactivación de *lasR* y su sobre-expresión en la expresión de genes del SST3. La delección del gen *lasR* disminuye la expresión de las fusiones transcripcionales pC-lux y pS-lux, mientras que en la cepa PAO1 silvestre la sobre-expresión de *lasR* (plásmido pMT1) disminuye la actividad de pC-lux, pero no la de pS-lux. Cada replica biológica se realizó al evaluar, por triplicado, 200 μ L de cultivo a una D.O.₆₀₀= 0.8 (fase logarítmica tardía) obtenidos de 15 ml de medio inductor incubado a 37 °C y 225 rpm. Plásmidos: pC-lux (*exsCEBA*), pS-lux (*exoS*), pMT1 (*lasR*⁺⁺), pUCP20 (plásmido vacío). La línea punteada-roja corresponde al valor de la cepa PAO1-pX₂, utilizado como control negativo de luminiscencia. Se muestra el promedio de 3 réplicas biológicas \pm desviación estándar. Diferencia significativa *t*-student: (*, P<0.05); (**, P<0.01); (***, P<0.001); n.s., no significativa).

Tabla 7.- Efecto de la inactivación de *lasR* y su sobre-expresión en la actividad transcripcional de genes representativos del SST3 durante la fase logarítmica tardía

Fusión transcripcional (promotor)	PAO1 silvestre (x10 ³)	$\Delta lasR$ -Ap (x10 ³)	PAO1 silvestre/vacío (x10 ³)	PAO1 silvestre/ <i>lasR</i> ⁺⁺ (x10 ³)
pC-lux (<i>exsCEBA</i>)	150.3 \pm 18.7	23.9 \pm 1.8	114.7 \pm 14.0	74.2 \pm 8.4
pS-lux (<i>exoS</i>)	30.5 \pm 5.5	9.8 \pm 0.5	15.6 \pm 3.0	32.5 \pm 6.8

El valor de la actividad del control negativo pX₂, durante fase logarítmica tardía es menor a 5.0 x10³. Plásmidos: pC-lux (*exsCEBA*), pS-lux (*exoS*), pMT1 (*lasR*⁺⁺), pUCP20 (plásmido vacío). Cada replica biológica se realizó evaluando, por triplicado, 200 μ l de muestra obtenida a partir del cultivo de 15 ml en medio inductor incubado a 37 °C y 225 rpm. Se muestra el promedio de 3 réplicas biológicas \pm desviación estándar.

Por lo tanto, si la cascada de QS se mantiene en estas condiciones de inducción, entonces la sobre-expresión del regulador LasR incrementaría la expresión del sistema Rhl y en consecuencia la actividad transcripcional del SST3. Para nuestra sorpresa, la sobre-expresión de LasR en la cepa silvestre PAO1 reduce al 50% la expresión de *exsCEBA* (pC-lux); pero no afecta la actividad de *exoS* (pS-lux); además, observamos un efecto del vector vacío pUCP20 sobre la actividad de ambas fusiones en la cepa silvestre que no se explica.

El efecto que tiene la sobre-expresión de *lasR* en la cepa PAO1 silvestre y que reduce al 50% la expresión de *exsCEBA* podría deberse a: 1) que se active la transcripción del represor transcripcional RsaL, como consecuencia de un incremento en la actividad del sistema Las; de ser así, RsaL podría reprimir la expresión de *lasR*, y con ello la cascada de QS, que se reflejaría en menos RhlR y por ende menor transcripción de los genes del SST3; 2) que RsaL reprima la expresión del operón *exsCEBA* directamente; y 3) la participación de otros elementos que afectan la actividad el SST3 que podrían depender del sistema Las. De cualquier manera, a pesar de que la sobre-expresión de *lasR* en la cepa silvestre disminuye al 50% la expresión de *exsCEBA*, lo que significa menos ExsA, tal disminución de ExsA no afecta la expresión de *exoS*, sugiriendo la existencia de mecanismo adicionales implicados en su regulación.

El efecto a nivel transcripcional podría aclararse si se analiza el efecto que ejerce la expresión constitutiva de RsaL (desde un promotor independiente) en la cepa PAO1 silvestre de tal manera que, si la actividad de *exsCEBA* muestra un comportamiento similar al de una cepa con el gen *lasR* inactivo, sería sugestivo de que RsaL reprime la actividad del SST3. Adicionalmente, podría evaluarse el efecto de la inactivación de *rsaL* sobre la expresión de genes del SST3, se esperaría que en este fondo genético incremente la actividad del SST3.

5.3.2. Efecto de LasR en la producción de exotoxinas

Para comprobar si el efecto observado a nivel transcripcional en la cepa $\Delta lasR$ se reflejaba a nivel traduccional, decidimos evaluar el efecto en la producción de las exotoxinas en las mismas condiciones. Para nuestra sorpresa, la inactivación de $\Delta lasR$ no afecta la producción de exotoxinas con respecto a la cepa silvestre; sin embargo, la sobre-expresión de *lasR* desde el vector pMT1 en la cepa silvestre, abate su producción (Figura 18). Estos resultados contrastan con lo esperado, ya que la inactivación de *lasR* reduce la transcripción de las fusiones evaluadas, pero no se refleja al nivel de producción de exotoxinas. El efecto a nivel transcripcional sugiere que LasR funciona como un regulador positivo; pero no queda claro por qué la inactivación de *lasR* no afecta la producción de exotoxinas; mientras que su sobre-expresión —en la cepa silvestre— abate la síntesis de ExoS y ExoT.

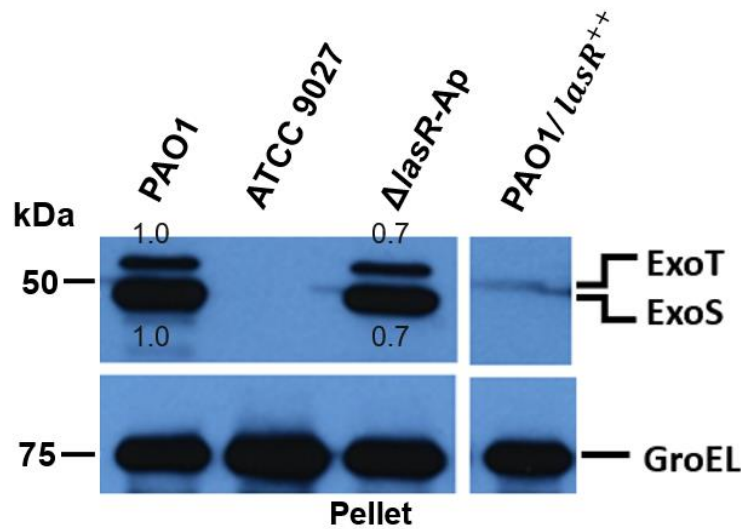


Figura 18.- Efecto de la inactivación de *lasR* y su sobre-expresión en la producción de exotoxinas. La inactivación de *lasR* no afecta la producción de exotoxinas S y T, es decir, no fenocopia a la mutante *rhIR* en la producción de exotoxinas. Sin embargo, la sobre-expresión de *lasR*⁺⁺ (plásmido pMT1) en la cepa silvestre, abate la producción de exotoxinas. PAO1 (control positivo), ATCC9027 (control negativo). La pastilla celular (pellet) fue obtenida de la toma de 1 ml de cultivo en medio inductor a D.O.₆₀₀=0.8. Se utilizó el suero diluido del anticuerpo policlonal anti-ExoS para la identificación de los polipéptidos ExoS y ExoT por su alto nivel de identidad. Como control de carga se utilizó el anticuerpo comercial anti-GroEL (Sigma®). La abundancia relativa de las bandas fue analizada con ImageJ®.

Estos datos sugieren que LasR regula de manera indirecta al SST3, a través de la activación de RhIR, pero que su inactivación no afecta la producción de exotoxinas, quizá porque hay una activación de RhIR independiente de LasR, como se ha demostrado en aislamientos de pacientes con fibrosis quística y/o porque en ausencia de LasR se activan mecanismo de regulación post-transcripcional.

Considerando que 1) la sobre-expresión de LasR en la cepa silvestre abate la producción de exotoxinas y reduce la actividad de *exsCEBA* y 2) la inactivación de *lasR* no afecta la producción de exotoxinas, pero disminuye la expresión de *exsCEBA*; estos datos podrían indicar que se activan mecanismos adicionales que podrían ser controlados por el sistema Las. Una explicación podría involucrar al regulador RsaL como represor del SST3, de ser así, la expresión de RsaL (que es mayor en la fase estacionaria) podría explicar porque las fusiones transcripcionales en las cepas silvestres disminuyen su expresión durante la fase estacionaria (Figura 15) a niveles similares que cuando no hay inducción (Figura 12). Para confirmarlo, podríamos sobre-expresar a RsaL en la cepa silvestre y observar si se abate la producción de las exotoxinas de manera similar al efecto de la sobre-expresión de LasR (Figura 18). Sin embargo, debido a las diferencias entre la actividad a nivel transcripcional y traduccional al inactivar y/o al sobre-expresar a *lasR* en la cepa silvestre, no descartamos la participación de reguladores post-transcripcionales que afecten la actividad de los genes del SST3. Estos resultados indican que la regulación del SST3 por el sistema Las es complicada e involucra la participación de reguladores adicionales, que dependen de este sistema de QS.

5.4. Efecto la doble inactivación de los genes *lasR* y *rhIR* sobre la actividad de genes representativos del SST3

En términos generales, sigue en debate el efecto que causa la doble inactivación de los sistemas Las y Rhl sobre la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 [68-70]. Además, en nuestras condiciones, el efecto de la inactivación del gen *rhIR* demuestra que no hay expresión del SST3 ni producción de exotoxinas, lo cual difiere con lo reportado previamente [66, 67]. Por lo anterior, decidimos evaluar el efecto de la doble inactivación de los genes de los reguladores transcripcionales LasR y RhIR. Para ello, fue necesario construir la doble mutante $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$, la cual posee marcadores de resistencia diferentes a los que se utilizan para la selección de las fusiones transcripcionales y que impedían utilizar una doble mutante, previamente construida ($\Delta lasR \Delta rhIR$) [69], para los ensayos de expresión con nuestras fusiones transcripcionales.

5.4.1. Efecto de la doble mutante $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$ sobre la expresión de las fusiones y la producción de exotoxinas

Después de construir la cepa doble mutante $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$ y confirmar la inactivación de los genes *lasR* y *rhIR*, las fusiones transcripcionales pC-lux y pS-lux se insertaron por electroporación a esta cepa (Figura MS3), y se analizó su expresión durante la fase logarítmica tardía. Como resultado, la expresión de *exsCEBA* y *exoS* disminuye 90% y 56%, respectivamente en la cepa $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$ comparados con la cepa PAO1 silvestre (Figura 19). Esta reducción a nivel transcripcional se refleja a nivel traduccional, ya que se abate la producción de exotoxinas (Figura 20). En consecuencia, observamos que la cepa $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$ fenocopia a la cepa $\Delta rhIR$, tanto a nivel transcripcional como traduccional, sugiriendo que el efecto de la inactivación de *rhIR* es dominante sobre la inactivación de *lasR* (Tabla 8). Esto podría comprobarse si se expresa constitutivamente a *rhIR* en la doble mutante $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$ y observar que incrementa la expresión de las fusiones transcripcionales y se recupera la producción de exotoxinas a niveles silvestres.

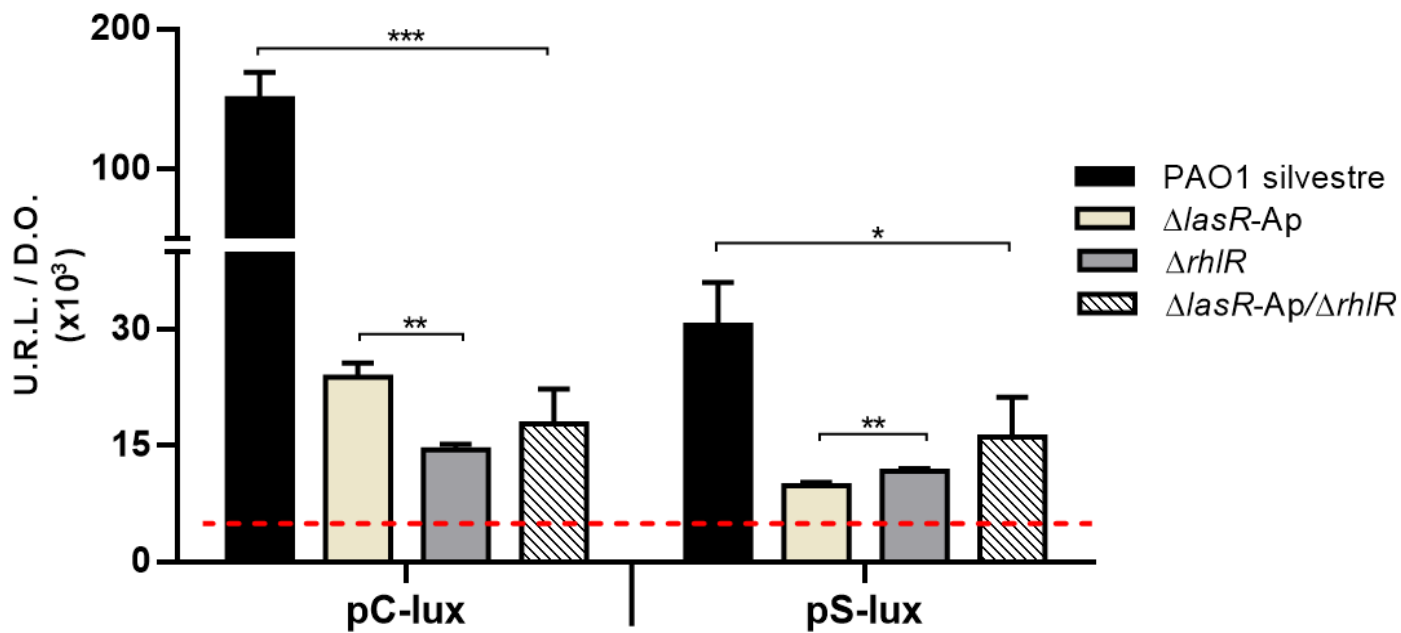


Figura 19.- Efecto de la doble mutante $\Delta lasR\text{-}Ap/\Delta rhIR$ en la expresión del SST3. A nivel transcripcional la doble inactivación de los genes *lasR* y *rhIR* (cepa $\Delta lasR\text{-}Ap/\Delta rhIR$) disminuye la actividad de las fusiones transcripcionales pC-lux y pS-lux, de manera similar a una mutante sencilla en *rhIR*. Cada replica biológica se realizó al evaluar, por triplicado, 200 μL de cultivo a una $D.O_{600} = 0.8$ (fase logarítmica tardía) obtenidos de 15 ml de medio inductor incubados a 37 °C y 225 rpm. Plásmidos: pC-lux (*exsCEBA*), pS-lux (*exoS*). La línea punteada-roja corresponde al valor de la cepa PAO1-pX₂, utilizado como control negativo de luminiscencia. Se muestra el promedio de 3 réplicas biológicas \pm desviación estándar. Diferencia significativa *t-student*: (*, $P < 0.05$); (**, $P < 0.01$); (***, $P < 0.001$); n.s.= no significativo.

Fusión transcripcional (promotor)	PAO1 silvestre (x10 ³)	$\Delta lasR\text{-}Ap$ (x10 ³)	$\Delta rhIR$ (x10 ³)	$\Delta lasR\text{-}Ap/\Delta rhIR$ (x10 ³)
pC-lux (<i>exsC</i>)	150.3 \pm 18.7	23.9 \pm 1.8	14.5 \pm 0.7	17.8 \pm 4.5
pS-lux (<i>exoS</i>)	30.5 \pm 5.5	9.8 \pm 0.5	11.7 \pm 0.3	16.1 \pm 5.1

El valor de la actividad del control negativo pX₂, durante fase estacionaria es menor a 3.0 x10³. Plásmidos: pC-lux (*exsCEBA*), pS-lux (*exoS*). Cada replica biológica se realizó evaluando, por triplicado, 200 μl de muestra obtenida a partir del cultivo de 15 ml en medio inductor incubado a 37 °C y 225 rpm. Se muestra el promedio de 3 réplicas biológicas \pm desviación estándar.

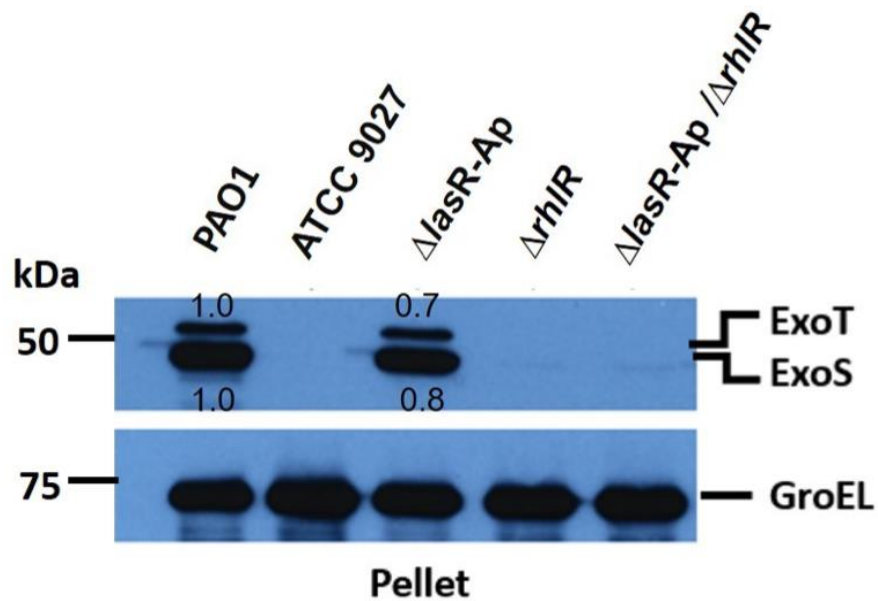


Figura 20.- Efecto de la doble mutante $\Delta lasR-Ap / \Delta rhIR$ en la producción de exotoxinas. A nivel traduccional la doble inactivación de los genes *lasR* y *rhIR* (cepa $\Delta lasR-Ap / \Delta rhIR$) fenocopia a la cepa $\Delta rhIR$ en la producción de exotoxinas S y T. PAO1 (control positivo), ATCC9027 (control negativo). La pastilla celular (pellet) fue obtenida de la toma de 1 ml de cultivo en medio inductor a D.O.₆₀₀=0.8. Se utilizó el suero diluido del anticuerpo policlonal anti-ExoS para la identificación de los polipéptidos ExoS y ExoT por su alto nivel de identidad. Como control de carga se utilizó el anticuerpo comercial anti-GroEL (Sigma®). La abundancia relativa de las bandas fue analizada con ImageJ®.

5.4.2. Diferencias entre las cepas dobles mutantes sobre la producción de exotoxinas

Debido a nuestro perfil de producción de exotoxinas (Figura 20) contrasta con lo reportado previamente [69], decidimos repetir el ensayo de producción de exotoxinas utilizando las cepas $\Delta lasR$ y $\Delta lasR\Delta rhIR$ reportadas por Soto-Aceves M y col., las cuales fueron construidas de manera similar a la doble mutante que se construyó para este trabajo, lo único que cambia es el marcador de selección que se utilizó para reemplazar al gen *lasR*, ya que se utilizó el plásmido pXLRTc que intercambia el gen *lasR* por el marcador de resistencia a tetraciclina. Como se mencionó previamente, las cepas reportadas por Soto-Aceves M y col., solo fueron consideradas para evaluar el perfil de producción de exotoxinas.

En nuestras condiciones, un primer ensayo, demostró que ambas mutantes sencillas en *lasR* (cepas $\Delta lasR$ y $\Delta lasR-Ap$) muestran el mismo perfil de producción de exotoxinas; es decir, producen exotoxinas a niveles silvestres. Sin embargo, la doble mutante $\Delta lasR\Delta rhIR$, reportada por Soto-Aceves M y col., sigue produciendo exotoxinas a niveles similares a los de la cepa silvestre como previamente se había reportado [69]. Mientras que en la doble mutante $\Delta lasR-Ap / \Delta rhIR$, construida para este proyecto, se abate la producción de exotoxinas (Figura MS4).

Debido a las diferencias en el perfil de producción de exotoxinas entre las cepas dobles mutantes; decidimos comprobar nuevamente las mutaciones por reacciones de PCR, secuenciación de la región modificada y finalmente evaluar los niveles de producción del autoinductor C_{12} —perfil dependiente del regulador LasR. Lo anterior nos permitió confirmar la correcta construcción de ambas dobles mutantes y que no existen modificaciones, al menos en las regiones de recombinación, que expliquen las diferencias observadas en el perfil de producción de exotoxinas (Figuras MS5 y MS6).

Debido a que la única diferencia entre estas dobles mutantes es el marcador de resistencia que se utilizó para inactivar al gen *lasR*. Decidimos comprobar que la

expresión de *rhIR* era suficiente para restaurar la producción de exotoxinas en nuestra doble mutante. Por lo cual, movilizamos el plásmido pGMYC a nuestra cepa $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$ y posteriormente evaluamos el perfil de producción de exotoxinas durante la fase logarítmica tardía en condiciones de inducción a 37 °C y 225 rpm (Figura 21).

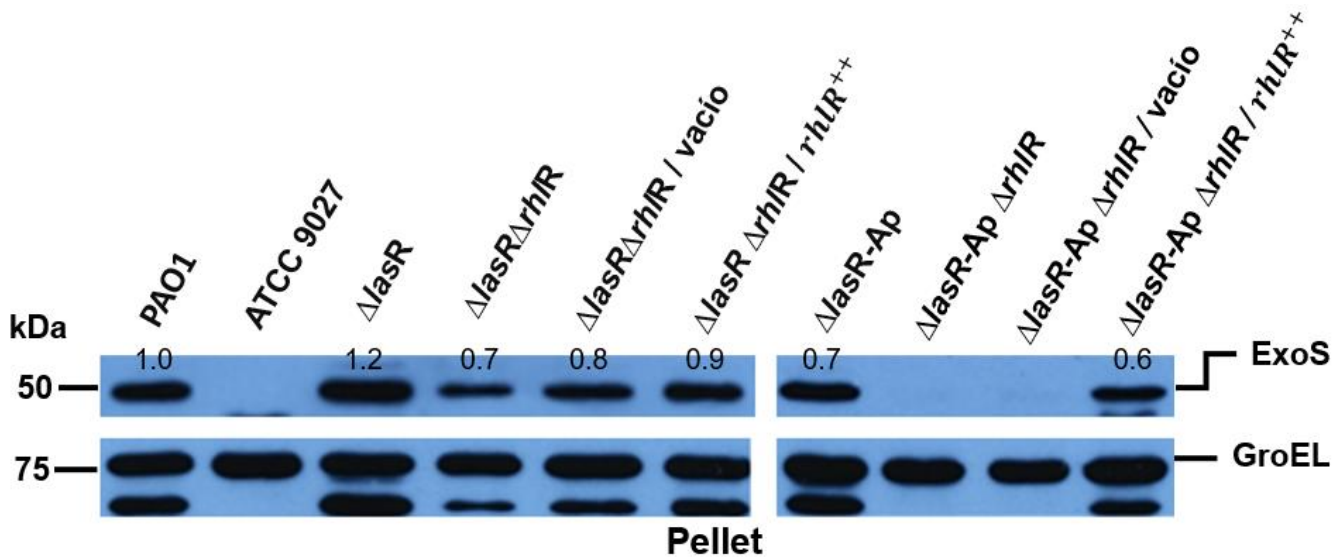


Figura 21.- Efecto de las dobles mutantes en la producción de exotoxinas. El perfil de producción de exotoxinas S y T entre las cepas dobles mutantes es distinto. La cepa $\Delta lasR\Delta rhIR$ (reportada por Soto-Aceves M y cols.) produce exotoxina S, mientras que en la cepa $\Delta lasR\text{-Ap}/\Delta rhIR$ (construida para este proyecto) se abate su producción. PAO1 (control positivo), ATCC9027 (control negativo). La pastilla celular (pellet) fue obtenida de la toma de 1 ml de cultivo en medio inductor a D.O.₆₀₀=0.8. Se utilizó el suero diluido del anticuerpo policlonal anti-ExoS para la identificación de los polipéptidos ExoS y ExoT por su alto nivel de identidad. Como control de carga se utilizó el anticuerpo comercial anti-GroEL (Sigma®). La abundancia relativa de las bandas fue analizada con ImageJ®.

Nuevamente observamos la baja reproducibilidad para la identificación de la exotoxina T, lo cual podría deberse a la especificidad del anticuerpo utilizado, como se mencionó anteriormente. No obstante, los resultados de la figura 21 demuestran que la *trans*-complementación con *rhIR* constitutivo en nuestra cepa doble mutante $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$, es suficiente para restaurar la producción de las exotoxinas a los niveles de la cepa PAO1 silvestre, los cuales son similares a los de la cepa $\Delta lasR\text{-Ap}$. Lo anterior demuestra que RhIR es necesario para la producción de exotoxinas y que se mantiene la cascada de QS en estas condiciones de inducción.

Es razonable que la doble inactivación de los genes *lasR* y *rhIR*, muestre un fenotipo similar a la cepa $\Delta rhIR$ a nivel transcripcional y traduccional. Debido a que, si LasR es un regulador negativo y RhIR un regulador positivo, se explicaría porque la ausencia de ambos reguladores abate la producción de exotoxinas y disminuye la transcripción. Sin embargo, no poseemos suficiente evidencia para explicar por qué la doble mutante (reportada por Soto-Aceves M y cols.) sigue produciendo exotoxinas, lo cual podría deberse a mecanismo QS-independientes aún sin explorar. Por lo tanto, enviamos a secuenciar el genoma de ambas cepas con la finalidad de que, en posteriores estudios, se analicen acuciosamente los genomas para identificar posibles diferencias que expliquen este efecto.

Los resultados de nuestra cepa $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$ y su complementación con *rhIR*, que restaura la producción de exotoxinas, nos permiten confirmar que el regulador RhIR es indispensable para la activación de los genes del SST3 durante fase logarítmica tardía.

CAPÍTULO VI. - DISCUSIÓN

El éxito de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* se basa en la producción de diversos factores de virulencia; algunos de los cuales son controlados a nivel transcripcional, por los sistemas de percepción de quórum que posee la bacteria. Se considera que los sistemas —Las, Rhl y Pqs— están organizados de manera jerárquica con el sistema Las en la cima de esta cascada de regulación, la cual permite coordinar una respuesta colectiva al controlar la expresión de al menos el 10% del genoma de la cepa PAO1 [8, 10].

El sistema Rhl tiene funciones relevantes en la patogenicidad de la bacteria debido a que: 1) controla la producción de factores de virulencia como piocianina, elastasa, lectinas, ramnolípidos y HCN [14, 17]; 2) puede activarse de manera independiente del sistema Las [18-20]; 3) la inactivación del gen *rhIR* (regulador transcripcional) reduce la virulencia de *P. aeruginosa* en diferentes modelos de infección, mientras que la inactivación del gen *rhII* (sintasa del autoinductor C₄) no lo hace [83-85]; 4) se ha propuesto la existencia de un grupo particular de genes que son controlados por un sistema Rhl no-canónico, destacándose la participación de la proteína PqsE para tal efecto [71, 86, 87]. Debido a la expresión de los genes que forman parte del sistema Rhl es finamente controlada [22-25, 83] y que a diferencia de LasR, no se han identificado cepas con un RhIR inactivo de manera natural, se resalta la importancia de este regulador. Además, parece ser que la actividad de RhIR es versátil, por lo cual podría responder a otras moléculas señalizadoras para controlar la virulencia de la bacteria, aún en ausencia de su autoinductor cognado C₄ [20, 83-85], por lo cual se convierte en un blanco terapéutico interesante para reducir la virulencia de esta bacteria.

6.1. Efecto del sistema Rhl en la actividad del SST3

La regulación que ejercen los sistemas Las y Rhl sobre la expresión de los genes del SST3 en la cepa PAO1 no se ha definido con claridad, por lo cual en este trabajo nos enfocamos en elucidarla. Mediante fusiones transcripcionales y ensayos

de Western Blot demostramos que, en condiciones de inducción, RhIR regula positivamente la expresión del operón *exsCEBA*, donde la expresión de *exsA* — como último elemento del operón— se traduce a la proteína ExsA, la cual activa la expresión de todos los elementos del SST3.

Nuestros resultados sugieren la existencia de la cascada de regulación transcripcional RhIR → *exsCEBA* → SST3. Además, demostramos que la sobre-expresión de ExsA es suficiente para revertir el efecto de la inactivación de *rhIR*, por lo cual, la actividad de las fusiones transcripcionales incrementa 3 veces su actividad con respecto a la cepa silvestre. Así mismo, este efecto se mantiene en la fase estacionaria, aunque con menor fuerza, para la región promotora del operón *exsCEBA*, indicando que RhIR regula positivamente a *exsCEBA* en fase logarítmica tardía y estacionaria.

Sin embargo, nuestros resultados contrastan con los reportados por Bleves S y col., quienes, utilizando las mismas condiciones de inducción, evaluaron fusiones transcripcionales de los principales genes del SST3 con el reportero *lacZ* en la cepa PAO1 a diferentes densidades celulares. Sus resultados muestran que la expresión de las fusiones incrementa al inactivar a *rhII*, pero disminuye a los niveles silvestres, después de complementar con el autoinductor C₄ sintético. Además, este grupo reporta que la exotoxina ExoS se secreta de manera temprana en la mutante en *rhII* comparada con la cepa silvestre. Por lo cual propusieron que el complejo RhIR-C₄ regula negativamente la expresión de los genes del SST3 [67]. No obstante, la expresión del operón *exsCEBA* no se modifica en la cepa $\Delta rhII$, a pesar de la importancia de este operón para la auto-regulación positiva del SST3. Lo anterior podría deberse a que su fusión transcripcional (pC-*lacZ*) contiene 249 pb del promotor del operón *exsCEBA*, mientras que nosotros, clonamos 353 pb del promotor —sin incluir el RBS— y lo fusionamos al reportero *lux* para obtener la fusión pC-*lux*. La diferencia entre las regiones clonadas son 104 pb, donde podrían ubicarse sitios de reconocimiento para RhIR o para algún otro regulador involucrado en la expresión de este operón, como es el caso de PsrA, un regulador positivo de *exsCEBA* [56], como se discute más adelante.

Adicionalmente, nuestros resultados muestran que la expresión del operón regulador *exsCEBA*, en la cepa PAO1, tiene un máximo de actividad de 3 a 5 h post-inducción, lo que corresponde a la fase logarítmica tardía. Estos niveles de actividad disminuyen cuando la bacteria alcanza la fase estacionaria, y son similares a los niveles basales del control negativo (pX_2), indicando que el sistema se apaga. Un efecto similar fue reportado por Zhou L y col., quienes reportaron un máximo de actividad de 3 a 5 h post-inducción para la fusión transcripcional *exsCEBA-lacZ* en la cepa PAO1 [88]. De la misma manera Milne-Davies B y col., reportaron que el SST3 de *Y. enterocolitica* —que pertenece a la familia Ysc, a la cual pertenece el SST3 de *P. aeruginosa*— tiene un máximo de secreción 2 a 3 h post-inducción a 37 °C [89].

Esto indica que se requiere la activación del SST3 durante las primeras fases del crecimiento de la bacteria, lo cual tiene una relevancia biológica ya que prepara a la bacteria para colonizar su nicho, no obstante, esta actividad debería disminuir después de que la bacteria se adapta; probablemente en respuesta a la expresión de reguladores QS-dependientes que se activan en altas densidades celulares. Sin embargo, Bleves S y col., reportan que al inactivar el gen *rhII*, incrementa la expresión de genes del SST3 y tal efecto persiste en densidades celulares mayores a un valor $D.O_{600} = 6.0$ sin que la expresión del sistema disminuya, incluso en la cepa silvestre. Otro inconveniente, es que en sus ensayos para identificar la exotoxina ExoS, no se observan cambios en la cantidad de la exotoxina secretada después de 3 h, lo que contrasta con el incremento de la actividad transcripcional reportada para sus fusiones, lo cual es sugestivo de la existencia de mecanismos adicionales que controlen la producción de las exotoxinas.

Nuestros resultados, también contrastan con los obtenidos por Hogardt M y cols., quienes realizaron ensayos de expresión a nivel de células individuales para cuantificar la actividad de la fusión traduccional *exoS'-gfp* en mutantes de los genes *rhIR*, *rhII* y *rpoS*, desde la fase exponencial hasta el inicio de la fase estacionaria. Sus resultados muestran que el sistema Rhl regula de manera negativa la expresión del SST3 [66]. Sin embargo, reportan que una desventaja de los ensayos en células

individuales, son los fenómenos de biestabilidad ya que no representan un comportamiento grupal, y podrán estar cuantificando la actividad de células no cooperadoras. Además, en sus condiciones de inducción del SST3 utilizan glutamato monosódico 100 mM, el cual modifica la osmolaridad del medio y presumiblemente tiene un efecto a nivel metabólico —alterando el ciclo del ácido cítrico— lo que permite la generación de metabolitos derivados del acetil-CoA; los cuales además de activar al SST3, presumiblemente tengan otros efectos en la fisiología celular como se ha reportado previamente [90].

El SST3 es un determinante crítico para la virulencia de *P. aeruginosa* y necesario para establecer una infección, por lo cual está activo en fases tempranas del crecimiento [39-41]. No obstante, su actividad debe disminuir gradualmente, una vez que la bacteria ya se ha establecido en un nicho de infección. Es por ello que la regulación positiva de *exsCEBA* (principal operón regulador del SST3) por *RhIR*, en fases tempranas del crecimiento, le permitiría expresarse en coordinación con la activación de los sistemas de QS, y de esta manera la bacteria podría orquestar la síntesis de varios factores de virulencia importantes para su patogenicidad.

Existen ejemplos que demuestran una asociación entre la actividad de *RhIR* y la virulencia de diversas cepas de *P. aeruginosa*; por ejemplo, estudios realizados en la cepa de PAE90 —un aislado clínico con un *LasR* inactivo— demuestran que la inactivación del gen *rhIR* disminuye la citotoxicidad de la bacteria en modelos de infección aguda, la cual es mediada por el SST3 [20]. De manera similar, se ha reportado que la inactivación de *rhIR* en la cepa PA14 disminuye su virulencia en diferentes modelos de infección [71]. También, se ha observado que en la cepa MPAO1, la virulencia se atenúa como consecuencia de una disminución en la expresión de *rhIR*, lo cual se revierte al complementar con el gen *rhIR* constitutivo [83]. Por otro lado, la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 9027, que no posee los genes que permiten la estructura y regulación del SST3, se ha reportado como no virulenta en modelo de ratón quemado [78]. Estos datos sugieren que la inactivación del gen *rhIR* provoca una reducción en la virulencia a través de disminuir la producción de factores de virulencia como elastasa, ramnolípidos, piocianina, HCN y posiblemente

al disminuir la expresión de los genes del SST3. En este contexto, nuestros resultados son relevantes y sugieren un mecanismo diferente al descrito previamente, que consideraba a RhIR como un regulador negativo del SST3. Además, reportamos por primera vez el efecto positivo de RhIR sobre esta región promotora del operón *exsCEBA*.

Sin embargo, queda por determinar si el efecto de RhIR depende del autoinductor C₄ (sintetizado por RhII) y/o de la presencia de la proteína PqsE, ya que ambas mutantes sencillas ($\Delta rhII$ y $\Delta pqsE$) siguen produciendo exotoxinas a niveles similares a los de la cepa silvestre. Por lo tanto, será necesario evaluar una doble mutante $\Delta rhII$ - $\Delta pqsE$ para poder definir si RhIR necesita de los productos o de la actividad de estas dos proteínas, o quizá de alguna otra molécula señalizadora, que le permita a RhIR adoptar una conformación no-canónica y activar la transcripción del operón *exsCEBA*. De lo contrario, RhIR podría regular sin la necesidad de su autoinductor cognado C₄, como se ha demostrado para la regulación de *rhIA* [17].

De la misma manera, será necesario definir si la regulación de RhIR sobre *exsCEBA* es de manera directa o indirecta. Respecto a esto, un primer acercamiento fue la búsqueda bioinformática de motivos de unión para RhIR en las regiones reguladoras de los genes del SST3 utilizando la plataforma MAST [91], sin resultados positivos, lo cual es sugestivo de que RhIR regula de manera indirecta al SST3 (Figura MS7). Por lo tanto, es posible que RhIR pueda regular la actividad de algún activador transcripcional del operón *exsCEBA*, tales como PsrA o PA_2592. Como se mencionó anteriormente, PsrA regula positivamente la expresión del operón *exsCEBA*, lo cual se ha demostrado por fusiones transcripcionales y ensayos EMSA, utilizando 332 pb del promotor del operón *exsCEBA* y PsrA purificado. Sin embargo, no se ha reportado que la expresión de *psrA* sea regulada por RhIR ni se han descrito motivos de unión para RhIR [56].

Por otro lado, existe un motivo *las-box* en la región promotora ubicada entre los genes *vqsR* y PA_2592 de la cepa PAO1 [92], para este último gen se ha identificado un homólogo en la cepa de *P. aeruginosa* PAE90, llamado

PAE90_2721, el cual disminuye su expresión después de la inactivación de *rhIR* y ha sido propuesto como un regulador positivo del transportador de poliaminas EspEFGH [20]. Este sistema tipo ABC permite importar espermidina, un probable ligando de ExsA, que favorece la expresión del operón *exsCEBA*; ya que se ha demostrado que mutaciones en los elementos de este transportador provocan una disminución de la expresión de la fusión transcripcional *exsCEBA-lacZ* [93]. Por lo tanto, considerando que no se identificaron motivos de unión a RhIR en la región reguladora del operón *exsCEBA*, es probable que la regulación sea de manera indirecta. Por lo tanto, sería relevante evaluar si se modifica la expresión de los genes del operón *espEFGH*, así como los genes PA_2592 y *psrA* en una cepa $\Delta rhIR$, y así definir una regulación indirecta de RhIR sobre el operón *exsCEBA* a través de cualquiera de estos genes.

6.2. Efecto del sistema Las en la actividad del SST3

Con base en la organización jerárquica de los sistemas de QS, el sistema Las activa al sistema Rhl, a través de activar la transcripción de los genes *rhIR* y *rhII* [14, 82, 84], es por ello que uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la regulación del SST3 por el sistema Las.

Los resultados de la actividad de las fusiones transcripcionales en la cepa $\Delta lasR$ -Ap contrastan con los datos obtenidos por Bleves y col., debido a que ellos reportan que el regulador transcripcional LasR no participa en la regulación del SST3 [67]. Sin embargo, nosotros observamos que el efecto de la inactivación de *lasR* en la expresión de los genes del SST3 es similar al de la cepa $\Delta rhIR$, lo cual sugiere que la jerarquía del sistema Las sobre el sistema Rhl existe en estas condiciones de inducción. No obstante, esta reducción en la expresión no se refleja en la producción de exotoxinas. Además, la expresión constitutiva de *lasR* a partir del plásmido pMT1 en la cepa silvestre, abate la producción de exotoxinas y disminuye la actividad de del promotor *exsCEBA*. Es decir, la inactivación del gen *lasR* —que tiene como consecuencia la disminución en la expresión de *exsCEBA*— sugiere que funciona

como un regulador positivo, pero su sobre-expresión —que abate la producción de las exotoxinas— sugiere que funciona como un regulador negativo del SST3.

Considerando los efectos de la inactivación de *lasR*, una posible explicación es que la reducción de la actividad de *exsCEBA* es consecuencia de la disminución de RhlR en ausencia de LasR. Es decir, se inactiva la cascada de QS ($\text{Las} \rightarrow \text{Rhl}$) —lo cual a su vez disminuye la cantidad de RhlR— y, por lo tanto, disminuye la actividad de *exsCEBA*. Mientras que, a nivel traduccional, la inactivación de *lasR* permitiría la activación de algún regulador post-transcripcional que favorezca la traducción del 20% de ARNm de *exsA*, que es producido en la cepa ΔlasR -Ap, por lo cual observamos producción de exotoxinas. De esta manera, la sobre-expresión de LasR en la cepa silvestre, inactivaría a ese posible regulador post-transcripcional e impactaría en la producción de las exotoxinas, abatiendo su producción. Aunque no podemos descartar algún efecto represor de RsaL, que podría activarse al sobre-expresarse a LasR en la cepa silvestre y con ello disminuir la producción de exotoxinas y la actividad del promotor de *exsCEBA*. En este sentido, sería interesante evaluar el efecto de la inactivación de *rsaL* y su sobre expresión en la cepa PAO1 silvestre y analizar qué sucede con la actividad del SST3 a nivel transcripcional y traduccional.

Respecto a la regulación a nivel post-transcripcional del SST3, existen diversos mecanismos que controlan la traducción de ExsA. Después de la transcripción del ARNm de *exsA*, su traducción a proteína es regulada positivamente por la endoribonucleasa RNAasa E [94], las proteínas RsmA y DeaD [59]; mientras que es regulada negativamente por al menos un ARN pequeño no codificante, llamado sARN 0161, presumiblemente con la asistencia de Hfq [95]. Sin embargo, existe mayor evidencia de la participación de RsmA, un regulador post-transcripcional que forma parte del sistema Gac/Rsm, y que controla la expresión de varios genes de virulencia, entre ellos al SST3 en *P. aeruginosa* [96-100]. Además, la inactivación de *rsmA* fenocopia a una mutante en *exsA* en la expresión de genes del SST3, donde se abate su expresión [54], sin embargo, no se ha demostrado que RsmA reconozca la secuencia *leader* del transcrito de *exsCEBA* por ensayos de retardo

de ARN [99], por lo cual el mecanismo molecular de regulación post-transcripcional que ejerce RsmA sobre la traducción de *exsA* no ha sido descrito.

Considerando que RsmA favorece la traducción de ExsA, y que, en nuestras condiciones, la inactivación de *lasR* disminuye la cascada RhIR → *exsCEBA*; además que la sobre-expresión de *lasR* en la cepa PAO1 abate la producción de exotoxinas; proponemos que el sistema Las regula negativamente a RsmA. Sin embargo, no hay evidencia de que LasR regule directamente de forma negativa, por lo cual tendría que regular positivamente a alguno de los antagonistas de RsmA, como son los sARNs RsmV/W/Y/Z, los cuales adoptan estructuras secundarias de ARN que atrapan a RsmA y antagonizan su actividad [101]. Aunque también podría ser que LasR active la expresión de RsaL, y este último reprima directamente a RsmA. Lo que es claro es que existe un efecto a nivel post-transcripcional que está bajo el control del sistema Las y que afecta la actividad del SST3.

Lo anterior permitiría explicar por qué en la cepa Δ *lasR*-Ap disminuye la actividad de las fusiones transcripcionales, pero que no se refleja en la producción de exotoxinas. Es decir, ya que en nuestras condiciones de inducción se mantiene la cascada de QS, la ausencia de LasR disminuye al 20% la actividad de *exsCEBA*, como consecuencia de la disminución de la expresión de RhIR; sin embargo, también disminuiría la expresión de los sRNAs y se permitiría la liberación de RsmA para favorecer la traducción del poco ARNm de *exsA* —que proviene del 20% de actividad del operón *exsCEBA*— lo cual, sería suficiente para activar la producción de exotoxinas en la cepa Δ *lasR*-Ap. Adicionalmente, permitiría explicar por qué la sobre-expresión de LasR en la cepa silvestre PAO1 abate la producción de exotoxinas, ya que se sobre-expresarían los sRNAs para antagonizar el efecto positivo de RsmA sobre el transcrito de *exsA* y disminuiría su traducción a pesar de que haya expresión del promotor *exsCEBA*. Por lo tanto, estos resultados sugieren que existe una regulación a nivel post-transcripcional controlada por RsmA, el cual a su vez podría ser antagonizado por LasR (de manera indirecta) o por RsaL (de manera directa).

Nuestra hipótesis podría fortalecerse si en estudios posteriores se evalúa el motivo de unión a LuxR presente en la región promotora del gen *rsmZ*, la cual localizamos al realizar una búsqueda bioinformática utilizando la plataforma MAST [91] (Figura MS7).

6.3. Efecto de la doble mutante $\Delta lasR\text{-Ap}/\Delta rhIR$ en la actividad del SST3

Nuestra cepa doble mutante $\Delta lasR\text{-Ap}/\Delta rhIR$ fenocopia a la cepa $\Delta rhIR$; es decir, disminuye la expresión de las fusiones pC-lux (*exsCEBA*) y pS-lux (*exoS*) y se abate la producción de exotoxinas.

Nuestros resultados coinciden con los resultados obtenidos por Rumbaugh K y col., quienes al evaluar una doble mutante en las sintasas *lasI-rhII* de la cepa PAO1 en un modelo de ratón quemado, demostraron que no es virulenta. Esto sugiere que podría haber una reducción de los factores de virulencia dependientes de QS, incluido el SST3 [70]. No obstante, contrastan con lo reportado por López-Jácome LE y col., quienes reportan que el tratamiento con la N-acil-homoserina-lactonasa AiiM, una enzima degrada los anillos de lactona de los autoinductores C_{12} y C_4 [102], tiene como consecuencia la reducción en la producción factores de virulencia regulados por QS, excepto el SST3, en las cepas de referencia PAO1, PA14 y cepas clínicas aisladas de pacientes quemados [68]. La degradación de los autoinductores C_{12} y C_4 , se comprobó por HPLC, pero no se confirmó la degradación del autoinductor PQS; el cual es un autoinductor de naturaleza alquil-quinolona y pertenece al tercer sistema de QS que posee *P. aeruginosa*. En este sentido, la presencia de PQS junto con PqsR favorecen la formación del complejo PqsR-PQS, el cual activa la expresión del operón *pqsABCDE*, involucrado en la síntesis de alquil-quinolonas y la proteína PqsE, esta última junto con RhIR podrían desencadenar la activación del SST3. Lo anterior podría explicar porque hay secreción de exotoxinas, a pesar de la degradación de los autoinductores C_{12} y C_4 .

De igual manera, el perfil de producción de exotoxinas obtenido de nuestra doble mutante ($\Delta lasR\text{-Ap}/\Delta rhIR$) tampoco coincide con lo reportado por Soto-Aceves M y

col., quienes concluyen que la doble inactivación de *lasR* y *rhIR* no afecta la actividad del SST3 ni la producción de alquil-quinolonas, por lo cual la cepa sigue siendo virulenta en el modelo de absceso en ratón [69]. Después de comparar los perfiles de producción de las exotoxinas, en nuestras condiciones de inducción, para la doble mutante $\Delta lasR \Delta rhIR$ reportada por Soto-Aceves M y col., así como nuestra doble mutante $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$ confirmamos que existían diferencias en la producción de exotoxinas. Sin embargo, no son resultado de posibles mutaciones adicionales en las regiones utilizadas para generar la inactivación de los genes en ambas dobles mutantes, ya que dichas regiones fueron amplificadas y secuenciadas. Además, las mutaciones fueron comprobadas nuevamente por PCR y se evaluó la producción del autoinductor C₁₂ mediante un bioensayo en un modelo heterólogo —que depende de un LasR funcional. Los resultados mostraron que no hay diferencias entre ambas dobles mutantes, lo cual podría resolverse al analizar los resultados de la secuenciación del genoma de ambas cepas, donde quizá podamos encontrar mutaciones con ganancia de función que reviertan el efecto de la inactivación de *rhIR* en la cepa reportada por Soto-Aceves M y col., o la existencia de mecanismos no descritos que estén involucrados en la activación del SST3 QS-independiente.

Los resultados obtenidos de nuestra doble mutante $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$ fortalecen nuestra hipótesis donde RhIR es un regulador positivo y LasR un regulador post-transcripcional negativo. Esto permitiría explicar lo siguiente: 1) el efecto observado al inactivar a *rhIR*, ya que sin RhIR no habría transcripción de *exsCEBA*; 2) el efecto de la cepa $\Delta lasR\text{-Ap}$, ya que la ausencia de LasR permitiría la liberación de RsmA para favorecer la traducción del 20% de transcrito de *exsA*, y así activar al SST3; 3) la inactivación del SST3 en la cepa $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$, ya que la inactivación de *lasR*, permitiría la liberación de RsmA, pero no habría transcrito que controlar porque no hay RhIR que active la expresión del *exsCEBA*, en consecuencia, el resultado neto sería una reducción en la actividad del SST3 en la doble mutante.

Finalmente, nuestros resultados demuestran que —en condiciones de inducción—, el regulador transcripcional RhIR es indispensable para la activación transcripcional

del operón *exsCEBA*. Sin embargo, el mecanismo por el cual ejerce su efecto queda aún sin resolverse, pero hemos observado que depende parcialmente de la actividad de RhIR y/o PqsE. De esta manera, los reguladores que afecten la expresión de RhIR, tendrían un efecto indirecto sobre la expresión del SST3. Mientras que LasR podría ejercer un efecto negativo a nivel post-transcripcional al antagonizar la actividad de RsmA, ya sea indirectamente al favorecer la expresión de los sARNs que titulan a RsmA, o directamente mediante el represor RsaL.

El análisis de los resultados de este proyecto nos permite proponer un modelo de regulación del SST3 por los sistemas de QS (Figura 22). Futuras investigaciones podrían enfocarse en evaluar nuestras hipótesis y definir los mecanismos.

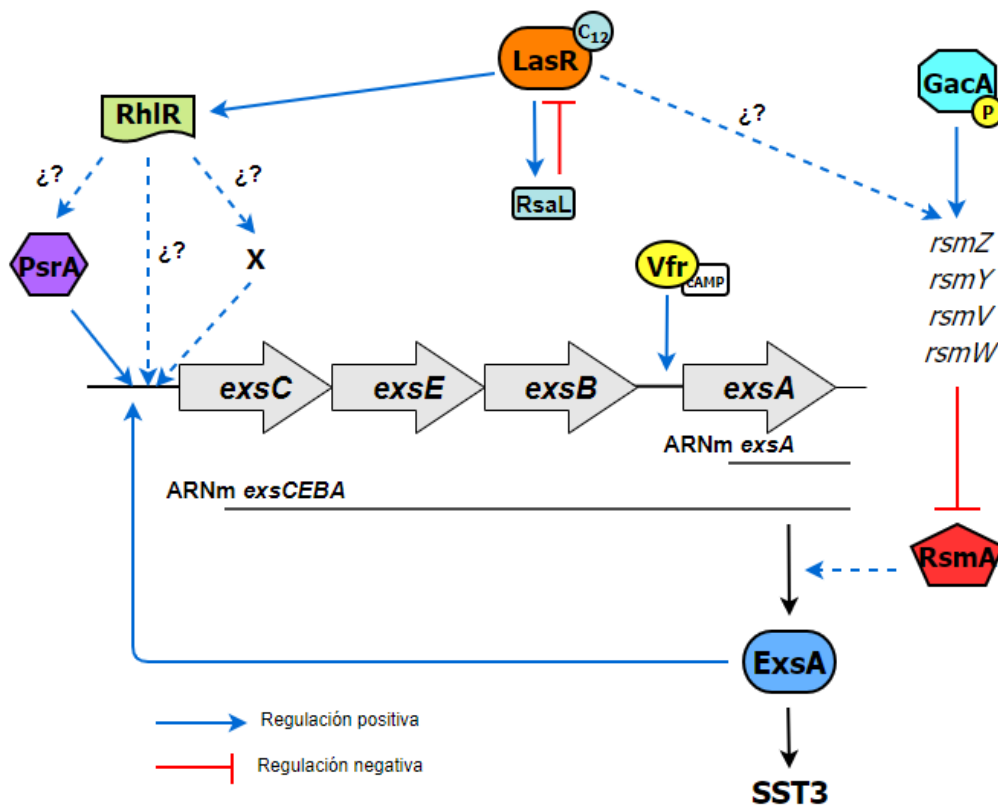


Figura 22.- Modelo de regulación de los sistemas Las y Rhl sobre la actividad del operón regulador *exsCEBA*. LasR podría regular positivamente la expresión de los antagonistas de RsmA; mientras que RhIR es un regulador positivo y probablemente indirecto del operón *exsCEBA*.

CAPITULO VII. – CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos de este proyecto nos permiten concluir lo siguiente:

- 1) RhIR regula de manera positiva de la expresión de *exsCEBA*, principal operón regulador del SST3 en *P. aeruginosa* PAO1, tanto en fase logarítmica tardía como en fase estacionaria.
- 2) La inactivación de la sintasa RhII, así como la inactivación de la tioesterasa PqsE, no afectan la producción de exotoxinas por el SST3.
- 3) La inactivación de LasR no afecta el perfil de producción de exotoxinas, pero su sobre-expresión abate su producción, lo cual sugiere que el sistema Las participa como un regulador negativo del SST3.

Considerando el beneficio de la perspectiva, se sugiere:

- 1) Evaluar el efecto de la inactivación de *rhIR* en el perfil de producción de exotoxinas durante la fase estacionaria.
- 2) Determinar si el efecto positivo que ejerce RhIR sobre la actividad del SST3 depende de la presencia RhII y PqsE, evaluando el perfil de producción de exotoxinas en una doble mutante *rhII-pqsE*.
- 3) Determinar si RhIR regula de manera indirecta la expresión del operón *exsCEBA*, a través de evaluar la expresión de los genes *psrA*, y PA_2592 en una cepa $\Delta rhIR$.
- 4) Determinar si LasR regula a alguno de los sARNs que antagonizan la actividad del regulador post-transcripcional RsmA.
- 5) Evaluar el efecto del represor RsaL sobre la actividad del SST3.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Lista de tablas:

Tabla 1.- Máquinas de secreción bacteriana.

Tabla 2.- Componentes estructurales del SST3 de *P. aeruginosa*.

Tabla 3.- Características de las exotoxinas de *P. aeruginosa*.

Tabla 4.- Actividad de las fusiones transcripcionales en condiciones de inducción en micro-cultivo.

Tabla 5.- Efecto de la inactivación de *rhIR* y la sobre-expresión de *exsA* en la actividad transcripcional de genes representativos del SST3 durante la fase logarítmica tardía.

Tabla 6.- Efecto de la inactivación de *rhIR* y la sobre-expresión de *exsA* en la actividad transcripcional de genes representativos del SST3 durante la fase estacionaria.

Tabla 7.- Efecto de la inactivación de *lasR* y su sobre-expresión en la actividad transcripcional de genes representativos del SST3 durante la fase logarítmica tardía.

Tabla 8.- Efecto de la inactivación de *lasR* y *rhIR* en la actividad transcripcional de genes representativos del SST3.

Tabla MS1.- Cepas y plásmidos utilizados en este proyecto.

Tabla MS2.- Oligonucleótidos y condiciones de PCR utilizados en este proyecto.

Lista de figuras:

Figura 1.- Comunicación celular por *quorum sensing* (QS).

Figura 2.- Organización jerárquica de los sistemas de QS en *P. aeruginosa*.

Figura 3.- Sistemas de secreción de *P. aeruginosa*.

Figura 4.- Esquema de la organización cromosómica de los genes del SST3 en *P. aeruginosa* PAO1.

Figura 5.- Estructura del SST3 en *P. aeruginosa*.

Figura 6.- Dominios catalíticos de las exotoxinas de *P. aeruginosa* PAO1.

Figura 7.- Modelo del reconocimiento de promotores dependiente de ExsA y reclutamiento del complejo σ^{70} - RNA polimerasa.

Figura 8.- Mecanismo de regulación intrínseca que controla la liberación de ExsA.

Figura 9.- Mecanismos de regulación que controlan la expresión de ExsA.

Figura 10.- Fusiones transcripcionales.

Figura 11.- Comprobación de la integración cromosomal de las fusiones transcripcionales.

Figura 12.- Activación de las fusiones transcripcionales en inducción.

Figura 13.- Efecto de la inactivación de *rhIR* y la sobre-expresión de *exsA* durante la fase logarítmica tardía.

Figura 14.- Efecto de la inactivación de *rhIR* y la sobre-expresión de *exsA* en la producción de exotoxinas.

Figura 15.- Efecto de la inactivación de *rhIR* y la sobre-expresión de *exsA* durante la fase estacionaria.

Figura 16.- Efecto de la activación de *rhII* y *pqsE* en la producción de exotoxinas.

Figura 17.- Efecto de la inactivación de *lasR* y su sobre-expresión en la expresión de genes del SST3.

Figura 18.- Efecto de la inactivación de *lasR* y su sobre-expresión en la producción de exotoxinas.

Figura 19.- Efecto de la doble mutante $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$ en la expresión del SST3.

Figura 20.- Efecto de la doble mutante $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$ en la producción de exotoxinas.

Figura 21.- Efecto de las dobles mutantes en la producción de exotoxinas.

Figura 22.- Modelo de regulación de los sistemas Las y Rhl sobre la actividad del operón regulador *exsCEBA*.

Figura MS1.- Construcción del plásmido pExsA.

Figura MS2.- Delección de 25.7 kpb en la cepa ATCC 9027 que inactiva al SST3.

Figura MS3.- Comprobación de la integración cromosomal de pC-lux y pS-lux en las cepas: $\Delta lasR\text{-Ap}$ y $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$.

Figura MS4.- Producción de exotoxinas en las cepas dobles mutantes.

Figura MS5.- Comprobación de los marcadores de resistencia en las dobles mutantes.

Figura MS6.- Cuantificación de la producción del autoinductor C₁₂.

Figura MS7.- Análisis bioinformático para la identificación de motivos LuxR.

Tabla MS1.- Cepas y plásmidos

Cepa	Genotipo y/o fenotipo relevante	Referencia
<i>E. coli</i> DH5αF'	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>), <i>phoA</i> supE44 λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> .	Invitrogen®
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Cepa silvestre, Protótrofa del grupo PAO1	79
PAO1-pX ₂	Tc ^R ; PAO1 con el control negativo pX ₂ integrado al cromosoma	Este trabajo
PAO1-pA-lux	Tc ^R ; PAO1 con la fusión transcripcional pS-lux integrada al cromosoma	Este trabajo
PAO1-pS-lux	Tc ^R ; PAO1 con la fusión transcripcional pS-lux integrada al cromosoma	Este trabajo
PAO1-pT-lux	Tc ^R ; PAO1 con la fusión transcripcional pT-lux integrada al cromosoma	Este trabajo
PAO1-pC-lux	Tc ^R ; PAO1 con la fusión transcripcional pC-lux integrada al cromosoma	Este trabajo
PAO1-pP-lux	Tc ^R ; PAO1 con la fusión transcripcional pP-lux integrada al cromosoma	Este trabajo
Δ <i>rhIR</i>	Sm ^R ; PAO1 mutante sencilla con delección del gene <i>rhIR</i>	17
Δ <i>rhIR</i> -pX ₂	Sm ^R ; Δ <i>rhIR</i> con el control negativo pX ₂ integrado al cromosoma	Este trabajo
Δ <i>rhIR</i> -pA-lux	Sm ^R ; Δ <i>rhIR</i> con la fusión transcripcional pA-lux integrada al cromosoma	Este trabajo
Δ <i>rhIR</i> -pS-lux	Sm ^R ; Δ <i>rhIR</i> con la fusión transcripcional pS-lux integrada al cromosoma	Este trabajo
Δ <i>rhIR</i> -pT-lux	Sm ^R ; Δ <i>rhIR</i> con la fusión transcripcional pT-lux integrada al cromosoma	Este trabajo
Δ <i>rhIR</i> -pC-lux	Sm ^R ; Δ <i>rhIR</i> con la fusión transcripcional pC-lux integrada al cromosoma	Este trabajo
Δ <i>rhIR</i> -pP-lux	Sm ^R ; Δ <i>rhIR</i> con la fusión transcripcional pP-lux integrada al cromosoma	Este trabajo
PAO Δ <i>rhII</i>	PAO1 mutante sencilla con delección del gene <i>rhII</i> , tratada con recombinasa Flp para retirar el marcador de selección	No publicado
Δ <i>lasR</i>	Tc ^R ; PAO1 mutante sencilla con delección del gene <i>lasR</i>	69
Δ <i>lasR</i> Δ <i>rhIR</i>	Tc ^R Sm ^R ; PAO1 doble mutante con delección de los genes <i>lasR</i> y <i>rhIR</i>	
ATCC 9027	Cepa no virulenta, aislada de oído externo. No posee SST3	78
Δ <i>lasR</i> -Ap	Apra ^R ; PAO1 mutante sencilla con delección del gene <i>lasR</i>	80
Δ <i>lasR</i> -Ap-pS-lux	Δ <i>lasR</i> -Ap; con la fusión transcripcional pS-lux integrada al cromosoma	Este trabajo
Δ <i>lasR</i> -Ap-pC-lux	Δ <i>lasR</i> -Ap; con la fusión transcripcional pC-lux integrada al cromosoma	Este trabajo

$\Delta lasR$ -Ap/ $\Delta rhIR$	Apra ^R Sm ^R ; PAO1 doble mutante, con delección de los genes <i>lasR</i> y <i>rhIR</i>	Este trabajo
$\Delta lasR$ -Ap / $\Delta rhIR$ -pS-lux	$\Delta lasR$ -Ap/ $\Delta rhIR$: con la fusión transcripcional pS-lux integrada al cromosoma	Este trabajo
$\Delta lasR$ -Ap / $\Delta rhIR$ -pC-lux	$\Delta lasR$ -Ap/ $\Delta rhIR$: con la fusión transcripcional pC-lux integrada al cromosoma	Este trabajo
$\Delta pqsE$	Gm ^R ; PAO1 con delección del gene <i>pqsE</i>	No publicado
Plásmidos	Características	Referencia
pX (mini-CTX-lux)	Tc ^R ; vector de clonación HKBS1 (integrativo en <i>Pseudomonas</i>). Permite hacer fusiones transcripcionales unicopia acopladas al <i>cluster</i> de genes del reportero de luminiscencia <i>luxCDABE</i> (AF251497).	75
pX ₂	Tc ^R ; fragmento de 400 pb que contiene una región no codificante clonada entre los sitios XhoI y HindIII del vector mini-CTX-lux. Control negativo de luminiscencia.	80
pA-lux (<i>exsA</i>)	Tc ^R ; fragmento de 388 pb que contiene la región promotora del gen <i>exsA</i> , de la cepa <i>P. aeruginosa</i> PAO1, clonada entre los sitios XhoI y HindIII del vector mini-CTX-lux.	80
pS-lux (<i>exoS</i>)	Tc ^R ; fragmento de 257 pb que contiene la región promotora del gen <i>exoS</i> , de la cepa <i>P. aeruginosa</i> PAO1, clonada entre los sitios XhoI y HindIII del vector mini-CTX-lux.	80
pT-lux (<i>exoT</i>)	Tc ^R ; fragmento de 257 pb que contiene la región promotora del gen <i>exoT</i> , de la cepa <i>P. aeruginosa</i> PAO1, clonada entre los sitios XhoI y HindIII del vector mini-CTX-lux.	80
pC-lux (<i>exsC</i>)	Tc ^R ; fragmento de 353 pb que contiene la región promotora del operón <i>exsCEBA</i> , de la cepa <i>P. aeruginosa</i> PAO1, clonada entre los sitios XhoI y HindIII del vector mini-CTX-lux.	Este trabajo
pP-lux (<i>spcS</i>)	Tc ^R ; fragmento de 357 pb que contiene la región promotora del gen <i>spcS</i> , de la cepa <i>P. aeruginosa</i> PAO1, clonada entre los sitios XhoI y HindIII del vector mini-CTX-lux.	Este trabajo
pUCP20 (vacío)	Cb ^R ; vector de clonación movilizable de alto número de copias; MCS bajo el control del promotor <i>plac</i> .	82
pMT1 (<i>lasR</i> ⁺⁺)	Cb ^R ; <i>plac-lasR</i> ; gen estructural <i>lasR</i> clonado en el vector pUCP20. Usado para <i>trans-complementar</i> la mutación en <i>lasR</i> . (Sobre expresa al gen <i>lasR</i> nativo)	84

pGMYC (<i>rhIR</i> ⁺⁺)	Cb ^R ; <i>plac-rhIR</i> ; gen estructural <i>rhIR</i> clonado en el vector pUCP20. Utilizado para <i>trans</i> -complementar la mutación en <i>rhIR</i> . (Sobre-expresa al gen <i>rhIR</i> nativo)	82
pPqsE (<i>pqsE</i> ⁺⁺)	Cb ^R ; <i>plac-pqsE</i> ; gen estructural <i>pqsE</i> clonado en el vector pUCP20. Utilizado para <i>trans</i> -complementar la mutación en <i>pqsE</i> . (Sobre-expresa al gen <i>pqsE</i> nativo)	No publicado
pExsA (<i>exsA</i> ⁺⁺)	Cb ^R ; <i>plac-exsA</i> ; gen estructural <i>exsA</i> clonado en el vector pUCP20. Utilizado para sobre-expresar al gen <i>exsA</i> en <i>trans</i> .	Este trabajo
pEX18ApGW	Apc ^R ; vector de reemplazamiento de genes derivado de la clonación del fragmento de recombinación gateway en el sitio de clonación múltiple de pEX18Ap.	77
pXLRapS	Apc ^R ; plásmido derivado de pEX18ApGW que funciona como un alelo de delección para reemplazar al gen <i>lasR</i> nativo por el marcador de resistencia a apramicina. El gen de resistencia a apramicina fue obtenido del plásmido pIJ733 con los oligonucleótidos 9522 y 9523 (2014).	No publicado
pECP64	Apc ^R ; biosensor que contiene la fusión traduccional <i>lasB</i> '- <i>lacZ</i> (3.75 kpb) derivado del plásmido pTS400 que fue clonado en pECP59 <i>tacp-lasR</i> . Utilizado como para cuantificar la producción del autoinductor C ₁₂ .	14
Abreviaciones: estreptomomicina 200µg/ml (Sm ^R); apramicina 200µg/ml (Apc ^R); tetraciclina 120µg/ml (Tc ^R); carbenicilina 200µg/ml (Cb ^R); gentamicina 100µg/ml (Gm ^R) transcripción bajo promotor <i>lac</i> (<i>plac</i>); transcripción bajo promotor <i>tac</i> (<i>tacp</i>), sitio de clonación múltiple (MCS).		

Tabla MS2.- Oligonucleótidos utilizados para la construcción de plásmidos y las condiciones de PCR utilizadas en este estudio					
Nombre	Oligonucleótidos	Secuencia en dirección 5'→3'	Código IBT	Tm (°C)	Producto (pb)
pX ₂	Lux_Fw	CACTATAGGGCGAATTGGGTA	2016-7460	60	985
	Lux_Rv	CCTGGCCGTTAATAATGAATG	2015-11508		
pA-lux (exsA)	PexsA_Fw	GAACTCGAGGAGTGCCTGGCAACAGGT	2018-4359	60	388
	PexsA_Rv	GCGAAGCTTGTCTGACCTTGAATGCCCC	2018-4360		
pS-lux (exoS)	PexoS_Fw	GAACTCGAGGCTGAGTACGCTCTCCTCGT	2018-4355	60	257
	PexoS_Rv	GCGAAGCTTGATGTTTCTCCGCCAGTCTA	2018-4356		
pT-lux (exoT)	PexoT_Fw	GAACTCGAGGCACCATAGCAGCAGACGAC	2018-4357	60	257
	PexoT_Rv	GCGAAGCTTATGTTTCCCCGCCAGTCTAG	2018-4358		
pC-lux (exsC)	PexsCEBA_Fw	CCGCTCGAGTGGCCAACACGGTGATCCAGT	2019-384	60	353
	PexsCEBA_Rv	CCCAAGCTTCTCAGCGCATGCTAGCACCG	2019-385		
pP-lux (spcS)	PspcS_Fw	CCGCTCGAGGTGCCGCACCCAAGCGAGCG	2019-386	60	357
	PspcS_Rv	CCCAAGCTTAGTCACTGGAGGCAGCCATT	2019-387		
pExsA (exsA ⁺⁺)	ExsA_Fw	TAAGGATCCAAAACGGAGCGTATTCAT	2019-4426	54	975
	ExsA_Rv	AAAAAGCTTAATTTGGGCCGATTCTACT	2019-4427		
pXLRApS	lasR_Up	tacaaaaaagcaggctCCGAACTGGAAAAGTGGC	2015-6709	60	487
	lasR5_Apra	gtcgacggatccccggaataCTTAAACTATTAACCAATC	2015-8653		
	lasR3_Apra	gaagcagctccagcctacaAATATTCGGCGGAAGTTTCG	2018-6514	60	644
lasR_Down	tacaagaaagctgggtCGAAAACCTGGGCTTCAG	2015-6710			

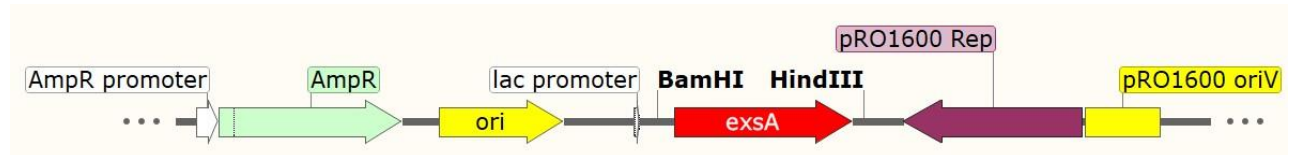


Figura MS1.- Construcción del plásmido pExsA. Se amplificaron 975 pb del ADN genómico de la cepa PAO1, esta región contiene solamente el gen estructural de *exsA*. El ADN digerido, purificado y clonado entre los sitios BamHI y HindIII del vector pUCP20, para obtener el plásmido pExsA (*exsA*⁺). La región clonada se verificó por ensayo de restricción y su integridad se comprobó por secuenciación, sin mostrar cambios.

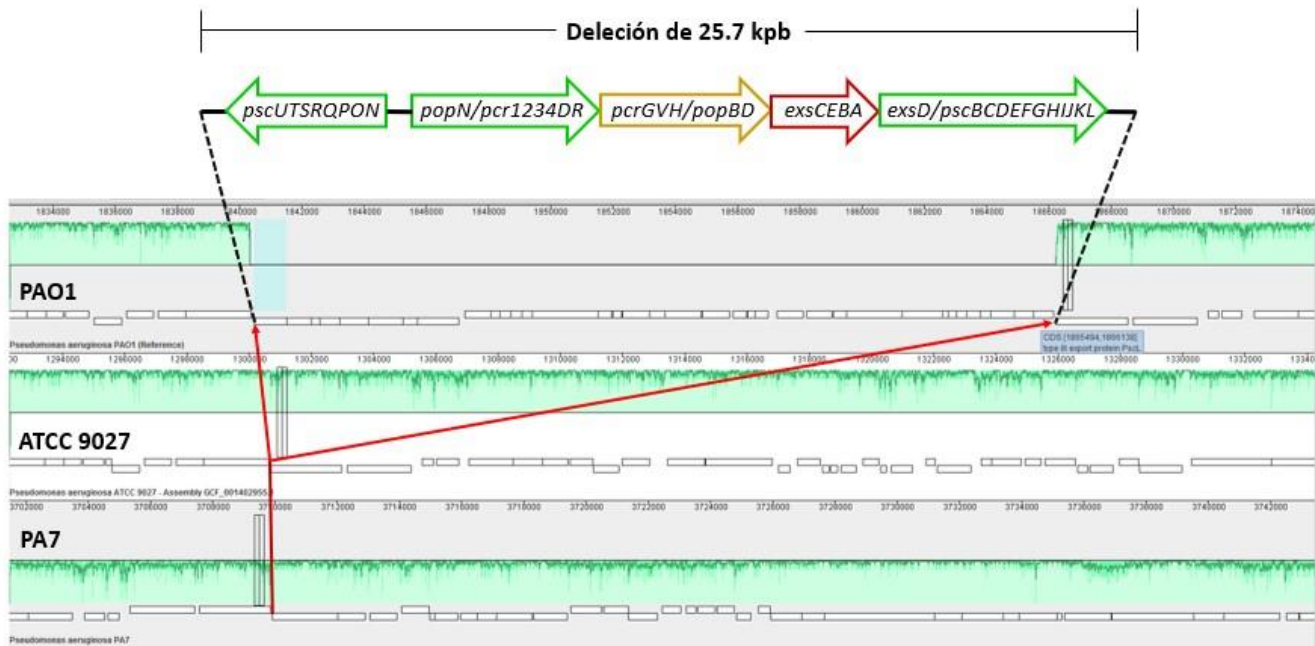


Figura MS2.- Delección de 25.7 kpb en la cepa ATCC 9027 que inactiva al SST3. El esquema de comparación entre la cepa del clado I (PAO1) y las cepas del clado II (ATCC 9027 y PA7) muestra la región genómica donde se ubican genes indispensables para la formación y regulación del SST3. La cepa ATCC 9027 carece de ésta región, por lo cual no tiene SST3 funcional.

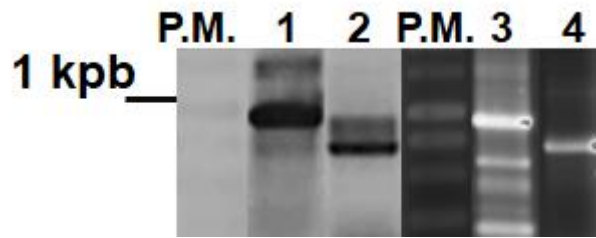


Figura MS3.- Comprobación de la integración cromosomal de pC-lux y pS-lux en las cepas $\Delta lasR$ -Ap y $\Delta lasR$ -Ap / $\Delta rhIR$. 1) $\Delta lasR$ -Ap-pC-lux; 2) $\Delta lasR$ -Ap-pS-lux; 3) $\Delta lasR$ -Ap / $\Delta rhIR$ -pC-lux; 4) $\Delta lasR$ -Ap / $\Delta rhIR$ -pS-lux. Las condiciones se muestran en la tabla MS2.

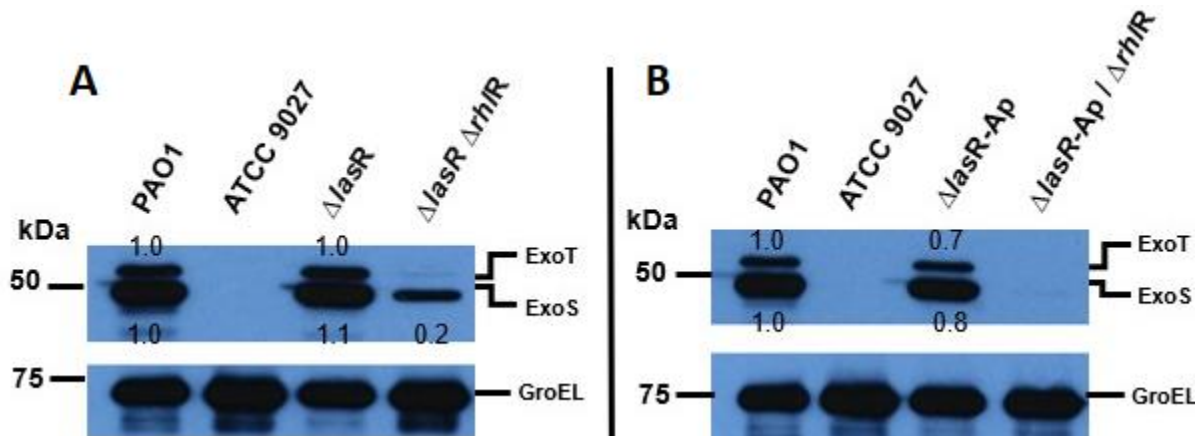


Figura MS4.- Producción de exotoxinas en las cepas dobles mutantes. Diferencias en el perfil de producción de exotoxinas entre las dobles mutantes. **A.-** Cepas reportadas por Soto-Aceves M y col; $\Delta lasR$ (mutante sencilla en *lasR*, con marcador de resistencia a tetraciclina); $\Delta lasR \Delta rhIR$ (doble mutante que produce exotoxinas); **B.-** Cepas utilizadas en este trabajo: $\Delta lasR$ -Ap (mutante sencilla en *lasR*, con marcador de resistencia a apramicina); $\Delta lasR$ -Ap / $\Delta rhIR$ (doble mutante que no produce exotoxinas); PAO1 (control positivo), ATCC9027 (control negativo). La pastilla celular (pellet) fue obtenida de la toma de 1 ml de cultivo en medio inductor a $D.O_{600}=0.8$. Se utilizó el suero diluido del anticuerpo policlonal anti-ExoS para la identificación de los polipéptidos ExoS y ExoT por su alto nivel de identidad. Como control de carga se utilizó el anticuerpo comercial anti-GroEL (Sigma®). La abundancia relativa de las bandas fue analizada con ImageJ®.

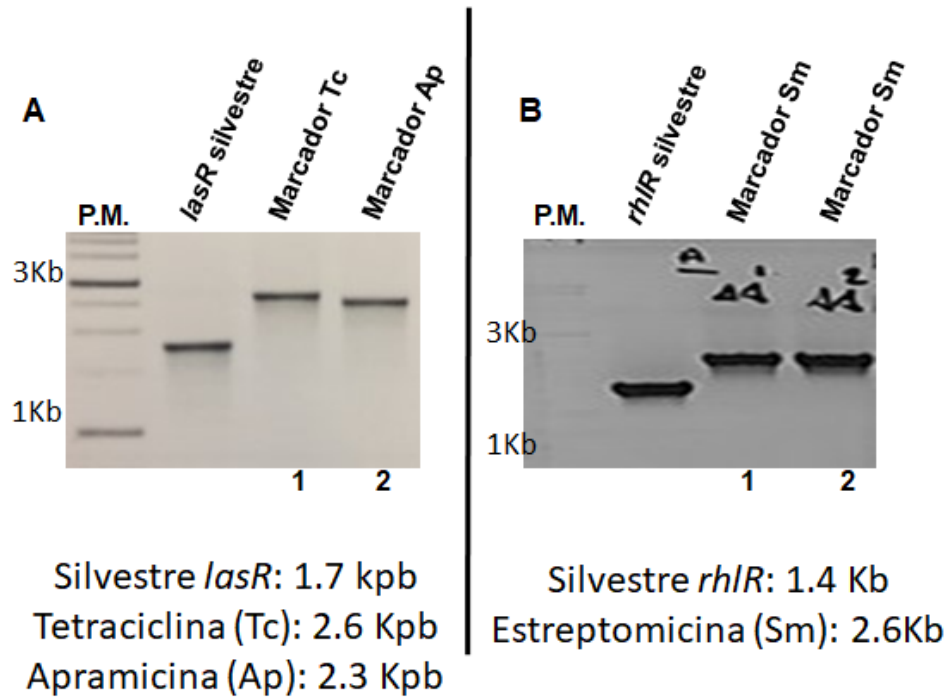


Figura MS5.- Comprobación de los marcadores de resistencia en las dobles mutantes. Se realizaron reacciones de PCR para demostrar que se reemplazaron los genes silvestres *lasR* (A) y *rhIR* (B), por los marcadores de resistencia correspondientes. 1) cepa $\Delta lasR \Delta rhIR$ reportada por Soto-Aceves y col.; 2) cepa $\Delta lasR\text{-Ap} / \Delta rhIR$ construida para este trabajo.

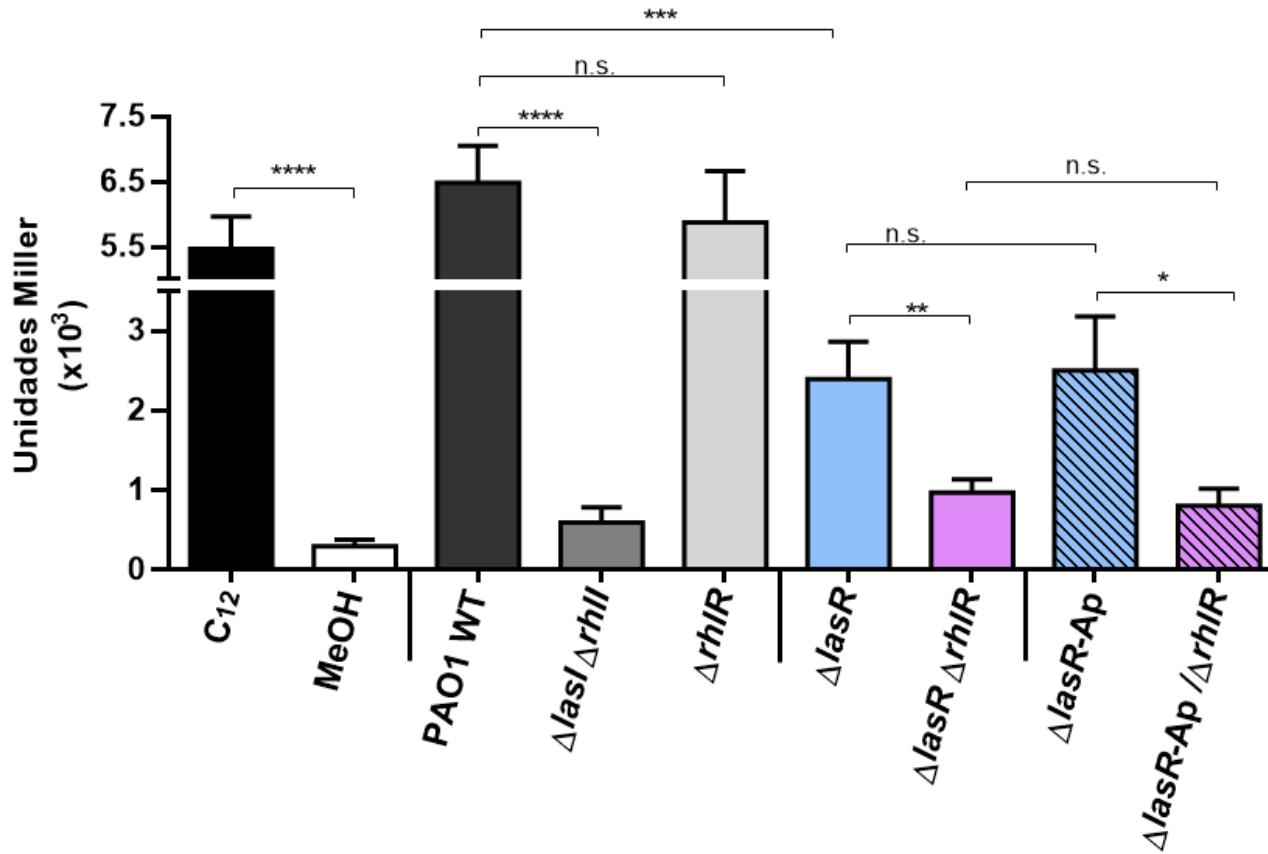


Figura MS6.- Cuantificación de la producción del autoinductor C₁₂. Bioensayo heterólogo para determinar la producción del autoinductor C₁₂ (que depende de un LasR activo) en la cepa *E. coli* DH5α. Se cuantificó la actividad de la fusión traduccional *lasB'-lacZ* (plásmido pECP64) a partir de los autoinductores previamente de extractos de las diferentes cepas de *P. aeruginosa*. La cuantificación de la actividad β-galactosidasa se representa en unidades Miller. Diferencia significativa *t-student*: (*, P<0.05); (**, P<0.01); (***, P<0.001); n.s.= no significativo.

Promotor	RhIR-box (MAST®)	LuxR (MAST®)	LuxR-box (Prodoric®)		ChIP-seq [51]	
	Valor de P	Valor de P	# Matrices	Valor max.	RhIR	LasR
<i>exsCEBA</i>	---	---	3	9.89	---	---
<i>exoS</i>	3.9 e ⁻⁵	3.2 e ⁻⁵	5	11.02	---	---
<i>exoT</i>	4.3 e ⁻⁵	---	3	9.41	---	---
<i>popN</i>	---	3.2 e ⁻⁵	4	10.02	---	---
<i>retS</i>	1.4 e ⁻⁵	---	3	9.93	---	---
<i>rsmY</i>	7.5 e ⁻⁵	---	5	10.01	---	---
<i>rsmZ</i>	---	9.6 e⁻⁶	6	10.57	---	---
<i>PA_2592</i>	1.5 e⁻⁹	1.6 e⁻⁸	6	11.17	---	Si
<i>spuF</i>	---	8.8 e ⁻⁵	6	9.98	---	---
<i>psrA</i>	---	---	6	9.97	---	---

Figura MS7.- Análisis bioinformático para la identificación de motivos LuxR. La búsqueda bioinformática se realizó utilizando las plataformas MAST ® y Prodoric ®. Se evaluaron las regiones reguladoras de genes que pertenecen al SST3, sistema RetS/LadS/Gac/Rsm, componentes del transportador de espermidina y del regulador PsrA. Solo se muestran los promotores donde se identificaron sitios putativos de unión a RhIR o LuxR.

REFERENCIAS

1. Broder UN, Jaeger T, Jenal U. LadS is a calcium-responsive kinase that induces acute-to-chronic virulence switch in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Microbiol*. 2016; 2:16184.
2. Erika D'Agata. *Pseudomonas aeruginosa* and other *Pseudomonas* species. En: Bennet J, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 8th ed. Canadá: Elsevier, 2015. p.2518-2531.
3. Stanier RY, Palleroni NJ, Doudoroff M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J Gen Microbiol*. 1966;43(2):159–271.
4. Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today*. 2019;24(1):350–359.
5. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406(6799):959–964.
6. Jiang Q, Chen J, Yang C, Yin Y, Yao K. Quorum Sensing: A Prospective Therapeutic Target for Bacterial Diseases. *Biomed Res Int*. 2019; 2019:2015978.
7. Krzyżek P. Challenges and Limitations of Anti-quorum Sensing Therapies. *Front Microbiol*. 2019; 10:2473. Published 2019 Oct 31.
8. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*. 2015;6(1):26–41.
9. Papenfort K, Bassler BL. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(9):576-588.
10. Juhas M, Eberl L, Tümmler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol*. 2005;7(4):459–471.
11. Schuster M, Greenberg EP. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol*. 2006;296(2-3):73–81.
12. Mukherjee S, Bassler BL. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(6):371–382.

13. Gambello MJ, Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol.* 1991;173(9):3000-3009.
14. Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol.* 1997;179(18):5756-5767.
15. García-Reyes S, Soberón-Chávez G, Cocotl-Yanez M. The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *J Med Microbiol.* 2020;69(1):25-34.
16. González-Valdez A, Servín-González L, Juárez K, Hernández-Eligio A, Soberón-Chávez G. The effect of specific *rhIA-las-box* mutations on DNA binding and gene activation by *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcriptional regulators RhIR and LasR. *FEMS Microbiol Lett.* 2014;356(2):217–225.
17. Morales E, González-Valdez A, Servín-González L, Soberón-Chávez G. *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing response in the absence of functional LasR and LasI proteins: the case of strain 148, a virulent dolphin isolate. *FEMS Microbiol Lett.* 2017;364(12):10.1093/femsle/fnx119.
18. Feltner JB, Wolter DJ, Pope CE, et al. LasR Variant Cystic Fibrosis Isolates Reveal an Adaptable Quorum-Sensing Hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio.* 2016;7(5): e01513-16.
19. Kostylev M, Kim DY, Smalley NE, Salukhe I, Greenberg EP, Dandekar AA. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(14):7027–7032.
20. Cruz RL, Asfahl KL, Van den Bossche S, Coenye T, Crabbé A, Dandekar AA. RhIR-Regulated Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing in a Cystic Fibrosis Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio.* 2020;11(2): e00532-20.
21. Mukherjee S, Moustafa DA, Stergioula V, Smith CD, Goldberg JB, Bassler BL. The PqsE and RhIR proteins are an autoinducer synthase-receptor pair that control virulence and biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(40): E9411–E9418.

22. Grosso-Becerra MV, Croda-García G, Merino E, Servín-González L, Mojica-Espinosa R, Soberón-Chávez G. Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by two novel RNA thermometers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(43):15562–15567.
23. Sonnleitner E, Schuster M, Sorger-Domenigg T, Greenberg EP, Bläsi U. Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 2006;59(5):1542–1558.
24. Thomason MK, Voichek M, Dar D, et al. A *rhlI* 5' UTR-Derived sRNA Regulates RhlR-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*. 2019;10(5): e02253-19.
25. Malgaonkar A, Nair M. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* mediated by RhlR is regulated by a small RNA PhrD. *Sci Rep*. 2019;9(1):432.
26. Higgins S, Heeb S, Rampioni G, Fletcher MP, Williams P, Cámara M. Differential Regulation of the Phenazine Biosynthetic Operons by Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1-N. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 8:252.
27. Farrow JM 3rd, Sund ZM, Ellison ML, Wade DS, Coleman JP, Pesci EC. PqsE functions independently of PqsR-Pseudomonas quinolone signal and enhances the rhl quorum-sensing system. *J Bacteriol*. 2008;190(21):7043-7051.
28. Rampioni G, Pustelny C, Fletcher MP, et al. Transcriptomic analysis reveals a global alkyl-quinolone-independent regulatory role for PqsE in facilitating the environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to plant and animal hosts. *Environ Microbiol*. 2010;12(6):1659-1673.
29. Rampioni G, Falcone M, Heeb S, et al. Unravelling the Genome-Wide Contributions of Specific 2-Alkyl-4-Quinolones and PqsE to Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog*. 2016;12(11):e1006029
30. Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol*. 2003;185(7):2066–2079.
31. Turkina MV, Vikström E. Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Innate Immun*. 2019;11(3):263–279.

32. Brouwer S, Pustelny C, Ritter C, Klinkert B, Narberhaus F, Häussler S. The PqsR and RhIR transcriptional regulators determine the level of Pseudomonas quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* by producing two different *pqsABCDE* mRNA isoforms. *J Bacteriol.* 2014;196(23):4163-4171.
33. Maura D, Hazan R, Kitao T, Ballok AE, Rahme LG. Evidence for Direct Control of Virulence and Defense Gene Circuits by the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Regulator, MvfR. *Sci Rep.* 2016; 6:34083.
34. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GP, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol.* 2010;300(8):534–543.
35. Pena RT, Blasco L, Ambroa A, et al. Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Front Microbiol.* 2019; 10:1100.
36. Green ER, Meccas J. Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr.* 2016;4(1): 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015.
37. Rüter C, Lubos ML, Norkowski S, Schmidt MA. All in-Multiple parallel strategies for intracellular delivery by bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol.* 2018;308(7):872–881.
38. Deng W, Marshall NC, Rowland JL, et al. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems [published correction appears in *Nat Rev Microbiol.* 2017 May 12;15(6):379]. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(6):323–337.
39. Wagner S, Grin I, Malmshemer S, Singh N, Torres-Vargas CE, Westerhausen S. Bacterial type III secretion systems: a complex device for the delivery of bacterial effector proteins into eukaryotic host cells. *FEMS Microbiol Lett.* 2018;365(19): fny201.
40. Diaz MR, King JM, Yahr TL. Intrinsic and Extrinsic Regulation of Type III Secretion Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2011; 2:89.
41. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(9):654–665.

42. Perdu C, Huber P, Bouillot S, et al. ExsB is required for correct assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion apparatus in the bacterial membrane and full virulence in vivo. *Infect Immun*. 2015;83(5):1789–1798.
43. Lombardi C, Tolchard J, Bouillot S, et al. Structural and Functional Characterization of the Type Three Secretion System (T3SS) Needle of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2019; 10:573.
44. Ohgita T, Saito H. Biophysical Mechanism of Protein Export by Bacterial Type III Secretion System. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2019;67(4):341–344.
45. Tang Y, Romano FB, Breña M, Heuck AP. The *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion translocator PopB assists the insertion of the PopD translocator into host cell membranes. *J Biol Chem*. 2018;293(23):8982–8993.
46. Dortet L, Lombardi C, Cretin F, Dessen A, Filloux A. Pore-forming activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system translocon alters the host epigenome. *Nat Microbiol*. 2018;3(3):378–386.
47. Lee PC, Zmina SE, Stopford CM, Toska J, Rietsch A. Control of type III secretion activity and substrate specificity by the cytoplasmic regulator PcrG. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(19): E2027–E2036.
48. Yahr TL, Wolfgang MC. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol*. 2006;62(3):631–640.
49. Garai P, Berry L, Moussouni M, Bleves S, Blanc-Potard AB. Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of *Pseudomonas aeruginosa* within macrophages revealed by mgtC and oprF mutants. *PLoS Pathog*. 2019;15(6): e1007812.
50. King JM, Schesser Bartra S, Plano G, Yahr TL. ExsA and LcrF recognize similar consensus binding sites, but differences in their oligomeric state influence interactions with promoter DNA. *J Bacteriol*. 2013;195(24):5639–5650.
51. Huang H, Shao X, Xie Y, et al. An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun*. 2019;10(1):2931.

52. Marsden AE, King JM, Spies MA, Kim OK, Yahr TL. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* ExsA DNA-Binding Activity by N-Hydroxybenzimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;60(2):766–776.
53. Vogelaar NJ, Jing X, Robinson HH, Schubot FD. Analysis of the crystal structure of the ExsC.ExsE complex reveals distinctive binding interactions of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion chaperone ExsC with ExsE and ExsD. *Biochemistry.* 2010;49(28):5870–5879.
54. Williams McMackin EA, Djapgne L, Corley JM, Yahr TL. Fitting Pieces into the Puzzle of *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Gene Expression. *J Bacteriol.* 2019;201(13): e00209-19.
55. Kang Y, Lunin VV, Skarina T, Savchenko A, Schurr MJ, Hoang TT. The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of rpoS and the type III secretion *exsCEBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2009;73(1):120–136.
56. Deng X, Li M, Pan X, et al. Fis Regulates Type III Secretion System by Influencing the Transcription of *exsA* in *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA14. *Front Microbiol.* 2017; 8:669.
57. Liang H, Deng X, Li X, Ye Y, Wu M. Molecular mechanisms of master regulator VqsM mediating quorum-sensing and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(16):10307-10320.
58. Castang S, McManus HR, Turner KH, Dove SL. H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(48):18947-18952. doi:10.1073/pnas.0808215105
59. Intile PJ, Diaz MR, Urbanowski ML, Wolfgang MC, Yahr TL. The AlgZR two-component system recalibrates the RsmAYZ posttranscriptional regulatory system to inhibit expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *J Bacteriol.* 2014;196(2):357-366.
60. Laskowski MA, Osborn E, Kazmierczak BI. A novel sensor kinase-response regulator hybrid regulates type III secretion and is required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2004;54(4):1090–1103.

61. Chen R, Weng Y, Zhu F, et al. Polynucleotide Phosphorylase Regulates Multiple Virulence Factors and the Stabilities of Small RNAs RsmY/Z in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2016; 7:247.
62. Zhu M, Zhao J, Kang H, Kong W, Liang H. Modulation of Type III Secretion System in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the PA4857 Gene Product [published correction appears in *Front Microbiol.* 2016; 7:881]. *Front Microbiol.* 2016; 7:7.
63. Song Y, Yang C, Chen G, et al. Molecular insights into the master regulator CysB-mediated bacterial virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2019;111(5):1195–1210.
64. Jin Y, Zhang M, Zhu F, et al. NrtR Regulates the Type III Secretion System Through cAMP/Vfr Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2019; 10:85.
65. Almblad H, Harrison JJ, Rybtke M, et al. The Cyclic AMP-Vfr Signaling Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Is Inhibited by Cyclic Di-GMP [published correction appears in *J Bacteriol.* 2015 Aug;197(16):2731]. *J Bacteriol.* 2015;197(13):2190–2200.
66. Hogardt M, Roeder M, Schreff AM, Eberl L, Heesemann J. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiology.* 2004;150(Pt 4):843–851.
67. Bleves S, Soscia C, Nogueira-Orlandi P, Lazdunski A, Filloux A. Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* 2005;187(11):3898–3902.
68. López-Jácome LE, Garza-Ramos G, Hernández-Durán M, et al. AiiM Lactonase Strongly Reduces Quorum Sensing Controlled Virulence Factors in Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burned Patients. *Front Microbiol.* 2019; 10:2657.
69. Soto-Aceves MP, Cocotl-Yañez M, Merino E, et al. Inactivation of the quorum-sensing transcriptional regulators LasR or RhlR does not suppress the expression of virulence factors and the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology.* 2019;165(4):425–432.

70. Rumbaugh KP, Griswold JA, Iglewski BH, Hamood AN. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun*. 1999;67(11):5854–5862.
71. Mukherjee S, Moustafa D, Smith CD, Goldberg JB, Bassler BL. The RhIR quorum-sensing receptor controls *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and biofilm development independently of its canonical homoserine lactone autoinducer. *PLoS Pathog*. 2017;13(7): e1006504.
72. Klockgether J, Munder A, Neugebauer J, et al. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J Bacteriol*. 2010;192(4):1113-1121.
73. Filloux A, Ramos JL. *Pseudomonas* methods and protocols. *Methods Mol Biol*. 2014;1149: v.
74. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed. Cold Spring Harbor Lab Press. 2012; Cold Spring Harbor, N.Y.
75. Becher A, Schweizer HP. Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal lacZ and lux gene fusions. *Biotechniques*. 2000;29(5):948–952.
76. Smith AW, Iglewski BH. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(24):10509.
77. Choi KH, Schweizer HP. An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. *BMC Microbiol*. 2005; 5:30.
78. Grosso-Becerra MV, González-Valdez A, Granados-Martínez MJ, et al. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is a non-virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(23):9995-10004.
79. Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, et al. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(24):14339-14344.
80. Soto-Aceves, M. P. Inactivación y silenciamiento de los sistemas sensores de quorum las y rhl y su efecto en la producción de factores de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*. 2017; Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México.

81. Ventre I, Ledgham F, Prima V, Lazdunski A, Foglino M, Sturgis JN. Dimerization of the quorum sensing regulator RhIR: development of a method using EGFP fluorescence anisotropy. *Mol Microbiol.* 2003;48(1):187-198.
82. Medina G, Juárez K, Valderrama B, Soberón-Chávez G. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhIR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J Bacteriol.* 2003;185(20):5976-5983.
83. Cao Q, Wang Y, Chen F, et al. A novel signal transduction pathway that modulates rhl quorum sensing and bacterial virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 2014;10(8): e1004340.
84. Medina G, Juárez K, Díaz R, Soberón-Chávez G. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhIR, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology.* 2003;149(Pt 11):3073-3081.
85. Haller S, Franchet A, Hakkim A, et al. Quorum-sensing regulator RhIR but not its autoinducer RhII enables *Pseudomonas* to evade opsonization. *EMBO Rep.* 2018;19(5): e44880.
86. Nouwens AS, Beatson SA, Whitchurch CB, et al. Proteome analysis of extracellular proteins regulated by the las and rhl quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology.* 2003;149(Pt 5):1311-1322.
87. Groleau MC, de Oliveira Pereira T, Dekimpe V, Déziel E. PqsE Is Essential for RhIR-Dependent Quorum Sensing Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *mSystems.* 2020;5(3): e00194-20.
88. Zhou L, Wang J, Zhang LH. Modulation of bacterial Type III secretion system by a spermidine transporter dependent signaling pathway. *PLoS One.* 2007;2(12): e1291.
89. Milne-Davies B, Helbig C, Wimmi S, Cheng DWC, Paczia N, Diepold A. Life After Secretion-*Yersinia enterocolitica* Rapidly Toggles Effector Secretion and Can Resume Cell Division in Response to Changing External Conditions. *Front Microbiol.* 2019; 10:2128.
90. Rietsch A, Mekalanos JJ. Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2006;59(3):807-820.

91. Bailey TL, Gribskov M. Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics*. 1998;14(1):48-54.
92. Li LL, Malone JE, Iglewski BH. Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. *J Bacteriol*. 2007;189(12):4367-4374.
93. Zhou L, Wang J, Zhang LH. Modulation of bacterial Type III secretion system by a spermidine transporter dependent signaling pathway. *PLoS One*. 2007;2(12):e1291.
94. Sharp JS, Rietsch A, Dove SL. RNase E Promotes Expression of Type III Secretion System Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2019;201(22): e00336-19.
95. Zhang YF, Han K, Chandler CE, Tjaden B, Ernst RK, Lory S. Probing the sRNA regulatory landscape of *P. aeruginosa*: post-transcriptional control of determinants of pathogenicity and antibiotic susceptibility. *Mol Microbiol*. 2017;106(6):919-937.
96. Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76(1):46-65.
97. Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gely I, et al. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(1):171-176.
98. Pessi G, Williams F, Hindle Z, et al. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa* [published correction appears in *J Bacteriol* 2002 Jan;184(1):335]. *J Bacteriol*. 2001;183(22):6676-6683.
99. Brencic A, Lory S. Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol*. 2009;72(3):612-632.
100. Mulcahy H, O'Callaghan J, O'Grady EP, et al. *Pseudomonas aeruginosa* RsmA plays an important role during murine infection by influencing colonization, virulence, persistence, and pulmonary inflammation. *Infect Immun*. 2008;76(2):632-638.

101. Vakulskas CA, Potts AH, Babitzke P, Ahmer BM, Romeo T. Regulation of bacterial virulence by Csr (Rsm) systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2015;79(2):193-224.
102. Fong J, Zhang C, Yang R, et al. Combination Therapy Strategy of Quorum Quenching Enzyme and Quorum Sensing Inhibitor in Suppressing Multiple Quorum Sensing Pathways of *P. aeruginosa*. *Sci Rep.* 2018;8(1):115.