



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Análisis del proteoma de la mutante en *rsmA* y su validación experimental
con énfasis en el factor sigma RpoS en *Pseudomonas aeruginosa* ID4365**

TESIS

**Que para obtener el título de
Química Farmacéutica Bióloga**

PRESENTA

Cristina Hernández Méndez

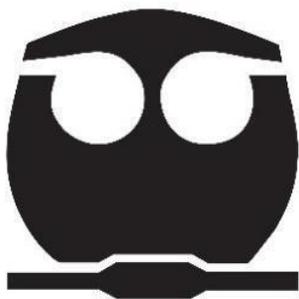
TUTOR:

Dr. Miguel Cocotl Yañez

Co-TUTOR:

M.C. Luis Fernando Montelongo Martínez

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Profesor: Martin Fuentes Ruth Edith
Vocal: Profesor: Dimitrova Dinkova Tzvetanka
Secretario: Profesor: Cocotl Yañez Miguel
1er. Suplente: Profesor: García Velázquez Lizbeth Esmeralda

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Este proyecto fue dirigido por el D. en C. Miguel Cocotl Yáñez 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.

Asesor del Tema: D. en C. Miguel Cocotl Yáñez

Supervisor Técnico: M. en C. Luis Fernando Montelongo Martínez

Sustentante: Cristina Hernández Méndez

EL PRESENTE PROYECTO FUE APOYADO POR EL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT) IA204221 Y FORDECYT-PRONACES 53366.

DEDICATORIA

A mis padres y hermano, en mi ser siempre vivirá su esencia

I. RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista en humanos que produce y libera un gran arsenal de factores de virulencia entre los que destaca la piocianina. En este proyecto se trabajó con la cepa ID4365 cuya característica importante es que sobreproduce piocianina en comparación con las cepas clínicas de referencia PAO1 y PA14. En un estudio en curso se obtuvo el proteoma de la cepa ID4365 y de su derivada mutante en *rsmA*. Un análisis inicial mostró que parte de los genes que aumentan su expresión son aquellos involucrados en degradar al factor sigma RpoS. Por lo tanto, en este proyecto realizamos un análisis detallado de las proteínas cuya expresión cambian en la mutante en *rsmA* con respecto a la cepa silvestre ID4365. Encontramos que los niveles de 512 proteínas totales que se mueven en la mutante en *rsmA*, 318 bajan y 194 aumentan, de estas, algunas están involucradas en la expresión del factor sigma RpoS. Posteriormente, mediante fusiones transcripcionales y traduccionales confirmamos que RsmA regula al factor sigma alternativo RpoS y mediante ensayos de western blot encontramos que en la mutante en *rsmA* los niveles de este factor sigma se ven reducidos, sugiriendo que RsmA es un regulador positivo de la expresión de *rpoS*. Finalmente, al expresar a *rpoS* bajo un promotor inducible en la mutante en *rsmA* los niveles de piocianina disminuyeron indicando que RpoS es un regulador negativo de la producción de esta fenazina y que en la cepa ID4365 existe una cascada regulatoria en la cual RsmA controla la producción de piocianina a través de controlar positivamente la expresión de *rpoS*.

II. GLOSARIO

Quórum Sensing: Es un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular.

Piocianina: Es una fenazina con propiedades oxido reductores, factor de virulencia producido por *P. aeruginosa*.

Sistema Rsm: Regulador de metabolismo secundario se compone por las proteínas RsmA y RsmN; así como por 4 RNAs pequeños no codificantes RsmV, RsmW, RsmY y RsmZ.

Factor sigma RpoS: Son proteínas que se encuentran en procariontes como subunidades de la ARN polimerasa. Le permiten reconocer las secuencias promotoras del ADN para iniciar la transcripción.

Sistema Las: Es un sistema de Quórum Sensing compuesto LasR que es el activador transcripcional y la sintasa LasI que produce el autoinductor N-3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona

Sistema Rhl: Sistema de Quórum Sensing formado por el regulador transcripcional RhIR y la sintasa RhII que produce el autoinductor N-butilil-homoserina lactona

Sistema Pqs: Es una proteína que interacciona con RhIR para iniciar la transcripción de *phz1* y *phz2* necesarias para la síntesis de piocianina.

III. ÍNDICE

I. RESUMEN	6
II. GLOSARIO.....	7
III. ÍNDICE	8
III. INTRODUCCIÓN	10
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2. Sistemas de <i>quorum sensing</i>	11
2.1. Sistema Las.....	12
2.2. Sistema Rhl	13
2.3. Sistema Pqs	13
3. Piocianina.....	13
4. Síntesis de piocianina	15
5. Sistema Csr/Rsm.....	16
6. Factor sigma RpoS.....	17
7. Regulación de la expresión de RpoS	18
IV. ANTECEDENTES	20
V. HIPÓTESIS	22
VI. OBJETIVOS:	22
1.1. Objetivo general	22
1.2. Objetivos	22
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	23
1.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo.....	23
1.2. Técnicas de manipulación de ADN.....	26
1.3. Construcción de fusiones transcripcionales de pLP _{rpoS} , pLP _{psrA} , pLP _{rssB} y pLP _{tig}	27
1.4. Construcción de fusiones traduccionales de pSEV _{rpoS} , pSEV _{psrA} y pSEV _{rssB} 27	
1.5. Protocolo de cuantificación de actividad β -galactosidasa.....	28
1.6. Análisis estadístico	30
1.7. Ensayos de expresión rpoS.....	30
1.8. Extracción y cuantificación de piocianina	30
1.9. Ensayos de Western blot.....	31
1.10 Análisis proteómico de las cepas ID _{rsmA} e ID4365	31
VIII. RESULTADOS	32
1.1. Análisis de los datos proteómicos de la cepa ID _{rsmA}	32

1.2. Comprobación de fusiones transcripcionales pLPrpoS, pLPpsrA, pLPrssB y pLPtig	36
1.3. Movilización de las fusiones transcripcionales a las cepas ID4365 eIDrsmA. ...	36
1.4. Actividad de las fusiones transcripcionales.....	37
Transcripción	38
1.5. Comprobación de fusiones traduccionales pSEVrpoS pSEVpsrA ypSEVrssB. .	38
1.6. Comprobación de la movilización de las fusiones traduccionales en.....	39
Pseudomonas aeruginosa	39
1.7. Actividad de las fusiones traduccionales	39
1.8. Efecto de la sobre-expresión de <i>rpoS</i> en la cepa IDrsmA.....	40
1.8.1. Cuantificación de pirocianina	41
1.9. La inactivación en <i>rsmA</i> reduce los niveles de la proteína RpoS.....	42
IX. DISCUSIÓN	44
X. CONCLUSIONES.....	48
XI. PERSPECTIVAS.....	48
XII. REFERENCIAS.....	49
XIII. ANEXO.....	60

III. INTRODUCCIÓN

1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa se describió por primera vez en el siglo XIX por Walter Migula en el instituto Karlsruhe (Palleroni et al., 2010). Pero fue el científico Schroeter quién dio a conocer el término “aeruginosa” en 1872, al describir la coloración verde-azulado que se presentaba en los medios de cultivo y dando indicios a que éste pigmento era soluble en agua (Schroeter et al., 1872). Más tarde se afirmaría que debido a la solubilidad de estos pigmentos se originaban coloraciones características, verde-azulados para piocianina o amarillo-verde para pioverdina (Peix et al., 2009). Sin embargo, *P. aeruginosa* fue aislada por primera vez en 1882 por Gessard en secreciones derivadas de pus con coloración verdosa directamente de heridas de pacientes infectados (Gessard et al., 1884).

Esta bacteria pertenece al orden Pseudomonadales, en clase Gammaproteobacteria (Mesquita et al., 2015). *P. aeruginosa* es un patógeno ubicuo en el medio ambiente, es decir que se puede aislar prácticamente de cualquier sitio, debido a su amplia capacidad de adaptación (Peix et al., 2009). *P. aeruginosa* es un bacilo largo de 1,5-5 μm y 0,5-1 μm de diámetro (Whitman et al., 2015). La gran capacidad que le permite desplazarse y poder colonizar hacia otros órganos se encuentra dada por un flagelo polar (Mesquita et al., 2015). Se considera como una bacteria aerobia facultativa debido a su capacidad de poder utilizar nitrógeno o arginina como aceptor terminal de electrones (Vander et al., 1984). Esta bacteria ha cobrado cada vez más relevancia considerándose como la quinta causa más frecuente en las infecciones en general a nivel mundial, la segunda causa de neumonía nosocomial, la tercera causa de infecciones urinarias, el cuarto de infecciones de sitios quirúrgicos y el séptimo responsable de sepsis (Pereira et al., 2015). Dentro de los patógenos más estudiados son aquellos que presentan gran resistencia a los antibióticos, sin duda, *P. aeruginosa* se encuentra en esta clasificación ya que forma parte de las bacterias denominadas ESKAPE, dentro de las que se clasifican bacteria como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, así como especies de *Enterobacter* las cuales son de importancia primordial por sus altos niveles de resistencia a los principales antibióticos utilizados en clínica, por ejemplo: β -lactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas (Oie et al., 2009). *P. aeruginosa* causa enfermedad principalmente en pacientes inmunocomprometidos

resaltando los pacientes con VIH, quemados o que padecen fibrosis quística (Elliot et al., 2017). Estudios han demostrado que la manera en que *P. aeruginosa* logra el estado de infección, es mediante su capacidad de poder manipular la interacción patógeno-huésped. (Lamont et al., 2003). Aunque este patógeno no infecta únicamente a seres humanos, al poder colonizar diversos sistemas es común que se encuentre asociado a infectar una gran diversidad de plantas y animales, incluso puede crecer en equipos inanimados como dispositivos médicos, habitaciones de hospitales, lavabos y duchas (Trautmann et al., 2009, Abreu et al., 2009). Este patógeno es responsable del 10% de infecciones nosocomiales, debido a su frecuencia es la segunda causa de muerte para pacientes con neumonía y la tercera en infecciones del torrente sanguíneo (BSI) (Afshari et al., 2012). Parte de este poderío infeccioso, se debe a que *P. aeruginosa* produce múltiples factores de virulencia tales como la elastasa, proteasa LasA, fosfolipasa C, exotoxina A, exoenzima S, ramnolípidos, cianuro de hidrógeno (HCN) y piocianina las cuales contribuyen a la patogénesis de esta bacteria (Delden et al., 1998).

Al estudiar la producción de estos factores de virulencia se dio a conocer que se encuentran controlados por circuitos reguladores y sistemas de señalización interconectados, que le dan a este patógeno una gran flexibilidad y adaptación, dichos sistemas son conocidos como sistemas de *quorum sensing* (Aboushleib et al., 2015, Jiménez et al., 2012).

2. Sistemas de quorum sensing

El sistema de *quorum sensing* (QS) se dio a conocer por primera vez en la bacteria marina *Aliivibrio fischeri* (*Vibrio fischeri*), la cual se identificó al observar que produce bioluminiscencia únicamente en altas poblaciones celulares, ya que se debe a la acumulación del auto inductor (Nealson et al., 1970). La comunicación que se da entre célula-célula bacteriana se ha definido como QS, sucede únicamente en altas poblaciones celulares y dependen de la detección de una molécula señal. Hoy en día, se ha documentado que los sistemas de QS regulan procesos celulares como bioluminiscencia, producción de factores de virulencia, formación de biopelículas, esporulación y apareamiento, según el microorganismo (Williams et al., 2009, Brassier et al., 2002). También, se ha reportado que en *P. aeruginosa* existen tres sistemas de QS, los cuales se organizan de manera jerárquica, según las condiciones de cultivo y son conocidos como Las, Rhl y Pqs. Estos se encuentran estrechamente relacionados y son regulados

a través de la detección de moléculas señal (llamadas auto-inductores) por proteínas que funcionan como reguladores transcripcionales y que les permiten controlar la expresión de diversos factores de virulencia y metabolitos secundarios (Schuster et al., 2003, Latifi et al., 1996). De esta manera los sistemas están organizados como se muestran en la figura 1, de manera jerárquica, con el sistema Las en la cima de la cascada de regulación. Particularmente, en medios ricos como el LB, el sistema Las activa la expresión de los sistemas Rhl y Pqs (Latifi et al 1996).

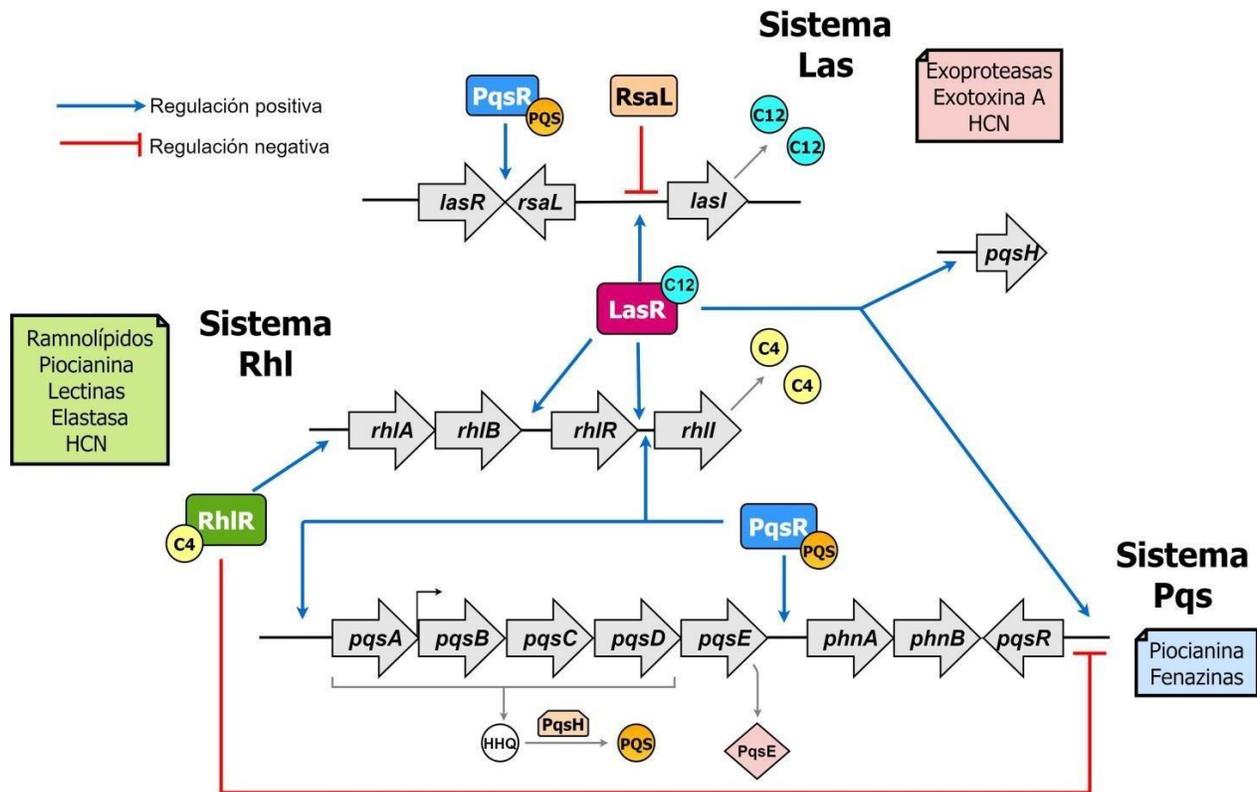


Figura 1. Organización jerárquica de los sistemas de QS en *P. aeruginosa*. Cada sistema regula directamente la expresión de un grupo particular de genes, los cuales están involucrados en la producción de diversos factores de virulencia. Los sistemas se organizan en una cascada regulatoria con el sistema 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 Garcia-Reyes et al., 2019.

2.1. Sistema Las

El sistema Las posee un factor transcripcional llamado LasR, el cual interacciona con el auto-inductor N-3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona (C12), producido por la sintasa *LasI*. De esta manera se forma el complejo LasR/C12, que tiene la función de promover la transcripción de los genes *lasB*, *lasI*, *rhlR*, *rhlI*, *pqsH* y *pqsR* que forman parte de los

sistemas Rhl y Pqs. También se ha descrito que induce la transcripción de *rsaL*, un gen integrado en el sistema Las que codifica para el regulador transcripcional negativo RsaL (Gilbert et al., 2009; De Kievit et al., 2002; De Kievit et al., 1999).

2.2. Sistema Rhl

Los genes *rhlR* y *rhlI* (que son activados por el complejo LasR/C12) codifican para el factor transcripcional RhlR y la sintasa RhlI, esta última produce el autoinductor N-butanoil-homoserinalactona (C4) que unido a RhlR forma el complejo RhlR/C4 que activa la transcripción de genes que participan en la síntesis de factores de virulencia como: *rhlAB* (ramnolípidos), *lecA* (lectina), *hcnABC* (ácido cianhídrico), *phzM* (piocianina), y los operones reiterados *phzA1-G1* y *phzA2-G2* (síntesis de fenazinas) (Medina et al., 2003).

2.3. Sistema Pqs

El tercer sistema se ha denominado *Pseudomonas* quinolone signal (Pqs), en este sistema las enzimas codificadas por el operón *pqsABCDE* producen los autoinductores de tipo alquil-4-quinolonas (AQ), las más importantes son la 2-heptil-4-hidroxi-4-quinolona (HHQ) -que es convertida en 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) por la mono-oxigenasa PqsH. Ambas moléculas señal, PQS y HHQ, pueden unirse y activar al regulador transcripcional PqsR. Los complejos PqsR/HHQ o PqsR/PQS pueden unirse a la región promotora del operón *pqsABCDE* incrementando su transcripción y generando un efecto de autorregulación positiva que aumenta la producción de AQs e incrementando la expresión de *pqsE*, codificado por el último gen estructural del operón *pqsABCDE* (Heeb et al., 2011; Dulcey et al., 2013).

PqsE es una tioesterasa involucrada en la biosíntesis de AQs, esta proteína controla de manera indirecta la expresión de múltiples factores de virulencia, el mecanismo por el cual PqsE influye sobre los genes blanco regulados por los sistemas de QS sigue siendo desconocido, aunque se ha documentado que funciona a través de controlar la actividad de RhlR (Drees & Fetzner, 2015; García-Reyes et al., 2020; Hazan et al., 2010; Rampioni et al., 2010, 2016).

3. Piocianina

Este pigmento, brinda la coloración azul-verdosa, característica de esta bacteria, sin embargo, el nombre que originaba la pigmentación azulada surgió hasta 1860 por Fordos,

que al igual que Gessard obtuvo muestras purulentas a partir de pacientes infectados por *P. aeruginosa*, aquí se origina el nombre del pigmento por la combinación de palabras griegas, utilizadas para designar pus (pyo) y el color azul (cyanin). En sus trabajos describió las propiedades de este pigmento, como su solubilidad y los colores que presentaba, aunque la mayoría únicamente hacía mención al color azul, también existían otras coloraciones características que se producían y que dependían de los diferentes valores de pH, que años más tarde se le daría el nombre del efecto camaleón (Joven et al., 1947; Kurashi et al., 1958). En 1924 se purificó la molécula piocianina convirtiéndose en la primera fenazina obtenida y purificada a partir de un laboratorio (Gaby et al., 1946). Después de años de largo trabajo Wrede y Straek propusieron una estructura química de la piocianina, aunque más tarde sería corregida por Hillemann y la estructura que hoy en día conocemos se dio a conocer en 1938 (Schoetal et al., 1941). Una de las ventajas que tiene *P. aeruginosa* es que logra inhibir el crecimiento de otros organismos procariontes y causar daño en células eucariotas, ya que la piocianina causa estrés oxidativo por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilos (HO) logrando incrementar el estrés oxidativo en las células y que pueda llegar a la muerte celular. (Hassan et al., 1980). En medios de cultivo como LB se ha observado que la coloración azul-verdosa se produce de las 48 a las 72 horas del inicio de su incubación, cuando las bacterias se encuentran en su fase estacionaria (Tamagnini et al., 1997). Las bacterias al encontrarse en constante interacción con el medio ambiente se encuentran expuestas a variaciones en la temperatura, el pH, nutrientes, todos estos factores van a influir en la síntesis de piocianina, al producir *P. aeruginosa* este compuesto la hace tener una ventaja sobre otros organismos (Barakat et al., 2015). Dentro de las características que posee la piocianina se encuentra la solubilidad que presenta en cloroformo y su difusión en agua, aunque se ha documentado que el rango de pH en el que oscila su producción es entre 7.4 y 8.4. La coloración azul intenso que produce es característica, se ha reportado que absorbe a una longitud de onda del rango 230-700 nm lo cual va a depender de la forma en que se encuentre ya sea protonada o desprotonada. (Kurashi et al., 1958, Moayedi et al., 2017). La piocianina tiene la propiedad de ser un compuesto hidrofóbico e hidrofílico, que le permite interactuar fácilmente con la membrana de varios organismos. Además, puede generar ROS en las células huésped logrando producir daño oxidativo celular, agotamiento de NADPH e inhibición enzimática (Barón et al., 1981; Hall et al., 2016).

Como se ha mencionado, la producción de piocianina es controlada a nivel transcripcional por los sistemas de QS (Hense et al., 2015). Curiosamente esta sustancia no es tóxica para *P. aeruginosa*, estudios han revelado que presenta resistencia al estrés oxidativo como resultado a dicha exposición, su mecanismo de resistencia suele estar asociado al producir catalasas, superóxido dismutasa y oxidorreductasas, promoviendo un ciclo redox mediado por NADPH, neutralizando la piocianina de su estado protonado, logrando el equilibrio en el medio intracelular, y en el medio ambiente (Hassett et al., 1992). Por otro lado, se tiene la perspectiva de que la piocianina llegue a ser de uso potencial para la industria o en la farmacología, debido a su naturaleza antimicrobiana que presenta. La piocianina ha sido empleada como antibiótico en la acuicultura contra la vibriosis, una enfermedad con una alta tasa de mortalidad, especialmente en el cultivo de camarón, la actividad antimicrobiana de la piocianina depende de la dosis y se puede controlar con el uso de antioxidantes, de igual manera puede utilizarse como antifúngico ya que también exhibe actividad contra ciertos hongos acuáticos (Priyaja et al., 2016).

Los agroquímicos son moléculas bioactivas naturales con uso potencial como pesticida, recientemente la piocianina demostró actividad potencial agroquímica contra *Magnaporthe grisea* y *Xanthomonas oryzae* en concentraciones de 150 y 200 mg/L, respectivamente. Además, aplicando el concepto de biocolorante, el tratamiento de muestras de tela de algodón con una solución de piocianina permitió lograr colores sólidos y duraderos, que varían de lila a rosa, lo que sugiere que el uso de piocianina es una fuente alternativa como textil natural, agente de color, dotado de una fuerte durabilidad y un interesante espectro de colores (Britto et al., 2020).

4. Síntesis de piocianina

La molécula precursora de la piocianina es el ácido corísmico (CA), el producto final en la vía shikimato (Sterrit et al., 2018). Para lograr la conversión de CA a ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), *P. aeruginosa* posee dos operones reiterados con >98% de similitud a nivel de secuencia de nucleótidos, los cuales están conformados por siete genes cada uno: *phzA1B1C1D1E1F1G1* (*phz1*) y *phzA2B2C2D2E2F2G2* (*phz2*). Para llegar a la síntesis de piocianina se encuentran involucrados dos pasos, primero el PCA se convierte en 5-metilfenazina-1-ácido carboxílico betaína (MPCBA), a través de una metiltransferasa específica de fenazina (PhzM). Después el MPCBA es catalizado por la proteína PhzS, con función de flavina dependiente monooxigenasa que implica la hidroxilación de la

betaína MPCBA a 1-hidroxi-5-metil fenazina, es decir, piocianina (Mavrodi et al., 2001, Jayaseelan et al., 2014). Existen otros derivados a partir del mismo precursor PCA, tales como la 1-hidroxifenazina (1-OHPHZ) y la fenazina-1-carboxamida (PCN), aunque modelos de infección han reportado que la piocianina es una de las más importantes por su poder oxidativo en presencia de oxígeno, por lo anterior es de las más estudiadas (Starkey et al., 2009, Lau et al., 2004). La regulación de la expresión de los operones *phz1* y *phz2* es distinto porque sus regiones promotoras son diferentes, su aporte en la producción de piocianina también lo es (Mavrodi et al., 2001). De manera más específica existe un regulador de tipo Lux, QscR, que está presente en la región promotora río arriba del operón *phz2*, pero no para el operón *phz1*, esta diferencia sugiere que la expresión de ambos operones se regule de manera distinta (Chugani et al., 2001). Ambos operones también son controlados a nivel post-transcripcional por RsmA (Ren et al., 2014).

5. Sistema Csr/Rsm

La proteína CsrA (*carbon storage regulator A*) o regulador de almacenamiento de carbono fue originalmente descrita en *E. coli* al controlar la síntesis de glicógeno, más tarde se identificó un homólogo en *P. aeruginosa*, el cual se llamó RsmA (*regulator of secondary metabolism*) sin embargo, a diferencia de *E. coli*, esta proteína no controla metabolismo primario, sino la producción de metabolitos secundarios. (Romeo et al., 1993, Romeo et al., 1998). El sistema Rsm en *P. aeruginosa* se compone por las proteínas de unión al ARNm, llamadas RsmA y RsmN; así como por 4 RNAs pequeños no codificantes que antagonizan el efecto de RsmA y RsmN, llamadas RsmV, RsmW, RsmY y RsmZ (fig 2). (Liu et al., 1995, Miller et al., 2016). De manera general, RsmA se considera un represor de la traducción, ya que bloquea el sitio de unión al ribosoma (RBS) con lo cual controla la traducción de los ARNm. En *P. aeruginosa* se ha establecido que una mutante *rsmA* produce altos niveles de piocianina, actuando como un regulador negativo de su producción, mientras que la sobreexpresión de *rsmA* disminuye los niveles no solo de piocianina si no también proteasas, la elastasa, la lectina y HCN. (Williams et al., 2001). Por otra parte, se ha descrito que RsmA es quien regula la expresión de los operones encargados de la producción de piocianina en la cepa M18, se ha reportado que regula negativamente el operón *phz1* y regula positivamente la expresión del operón *phz2* ambos a nivel post-transcripcional (Ren et al., 2014). Además, en la cepa ID4365 la

inactivación de *rsmA* disminuye la producción de ramnolípidos y elastasa mediante la reducción de los niveles de la proteína RhIR. Sin embargo, en esta cepa el aumento en la síntesis de piocianina sugiere que a pesar de que los niveles de proteína RhIR disminuyen en la cepa mutante *rsmA*, hay suficiente proteína RhIR para activar la síntesis de esta fenazina (Cocotl-Yañez et al., 2020).

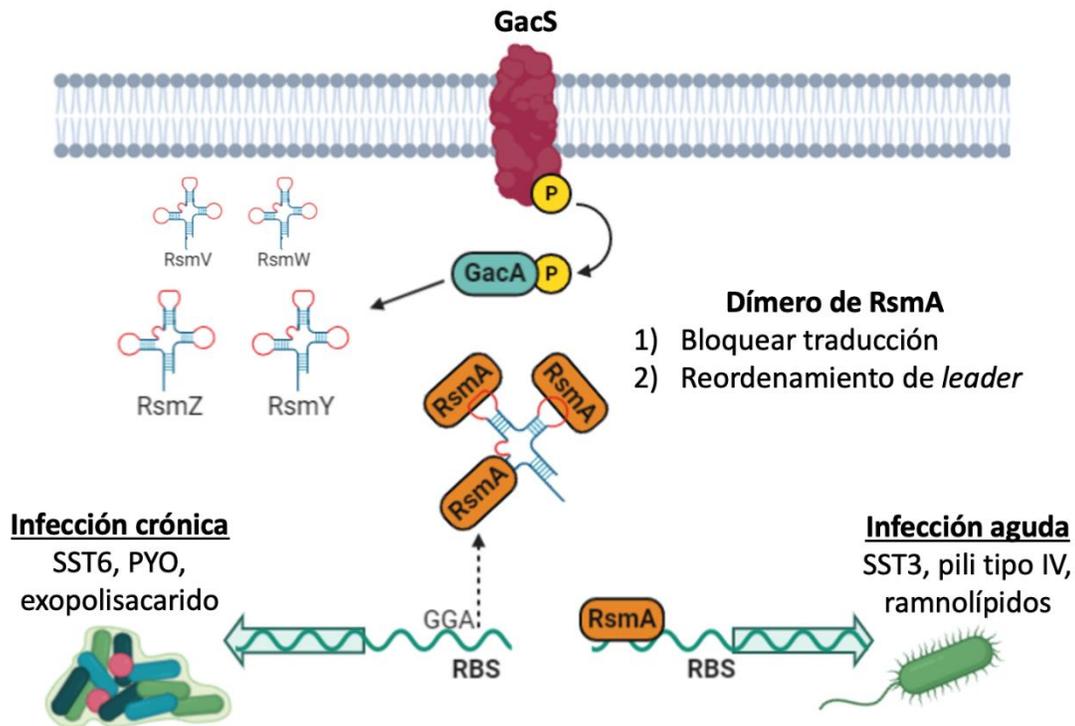


Figura 2. La red del sistema Gac en *P. aeruginosa* controla la transición reversible de infecciones agudas a crónicas. La fosforilación de GacA a través de GacS estimula la producción de los pequeños ARNs RsmZ y RsmY, que se unen a la proteína RsmA, liberando la represión de los factores de virulencia asociados con infecciones crónicas y reprimiendo la producción de infecciones agudas. Modificado de Jimenez et al., 2012.

6. Factor sigma RpoS

Las bacterias constantemente se encuentran en contacto con el medio ambiente, lo que implica que no siempre obtengan sus requerimientos necesarios, RpoS (o también conocido como sigma 38 o σ^{38}) participa en la expresión de genes relacionados en la protección cruzada a diversos tipos de estrés; cuando existe limitación de nutrientes, presión osmótica, estrés oxidativo, choque térmico que se presentan en la fase estacionaria (Loewen et al., 1998). En *E. coli* fue descrito por primera vez el factor sigma alternativo RpoS de la ARN polimerasa. Además del factor sigma housekeeping (sigma 70) que se encarga de controlar la transcripción de una gran cantidad de genes, las

bacterias también poseen factores sigma alternativos que están encargados de reconocer promotores específicos (Hengge-Aronis, 1999); Schellhorn, 2014). Dicho factor se expresa preferencialmente en fase estacionaria cuando las bacterias están sometidas a diferentes tipos de estrés. Así, cuando la enzima central de la ARN polimerasa se une al factor sigma 38 se origina una respuesta a nivel molecular en donde predominará este factor activando la transcripción de los genes controlados por RpoS (Hengge-Aronis et al 2000). Se ha identificado que RpoS controla el 10% del genoma de *E. coli* en condiciones de estrés (Weber et al., 2005). Mientras que para *P. aeruginosa*, son 772 genes regulados por RpoS en la fase estacionaria que corresponden al 14% de su genoma (Schuster et al., 2004).

Diversos factores sigma compiten para ocupar el núcleo de la ARN polimerasa, como resultado de esta competencia, se expresan diferentes conjuntos de proteínas en función de qué factor sigma está activo o unido a la ARN polimerasa central (Farell et al., 2003).

En *E. coli*, se ha demostrado que los niveles intracelulares de *rpoD* permanecen constantes a través de las fases de crecimiento, mientras que la concentración de *rpoS* aumenta durante el inicio de la fase estacionaria. Cuando los niveles de RpoS aumentan, el factor sigma RpoS puede posicionarse en la RNAP logrando desplazar al factor sigma 70 (Jishage et al., 1995)

Estudios *in vitro* demostraron que RpoS es regulado negativamente por RsmA en *P. protegens* CHA0 (Heeb et al., 2005) y recientemente se ha evidenciado que RsmA se une directamente al promotor de RpoS en *P. putida* regulándolo de manera negativa (Valverde et al., 2004), sin embargo en *P. aeruginosa* no se ha determinado si existe esta regulación.

7. Regulación de la expresión de RpoS

El factor sigma RpoS de fase estacionaria es el encargado de mediar la respuesta general al estrés y ha sido ampliamente estudiado en *E. coli* a partir del trabajo de Lange y Hengge-Aronis en 1994 donde construyeron fusiones transcripcionales y traduccionales estableciendo que la regulación de RpoS ocurre a diferentes niveles: transcripción, traducción y estabilidad de proteínas. (Lange y Hengge et al., 1994). Se han descrito los mecanismos para comprender más acerca de la regulación de *rpoS*. La transcripción de *rpoS* inicia a partir del promotor ubicado dentro del gene *nlpD* que codifica para una

lipoproteína de membrana externa, implicada en la división celular mediante el metabolismo de peptidoglicanos (Lange y Hengge et al., 1994). Se tuvo evidencia en 1990 que debido a la existencia de un 5'UTR largo se podría regular la expresión génica a través de ARN pequeños no codificantes (ncARNs), ahora se sabe que al menos tres ncARNs pueden participar de manera independiente para controlar la traducción de *rpoS* (Gottesman et al., 2019), los cuales son DsrA, ArcZ y RprA y cada uno necesita de Hfq para reconocer el 5' UTR de *rpoS*, y poder protegerlos de la degradación antes del emparejamiento. Cabe mencionar que cada ncARNs se produce en respuesta a señales diferentes (Battesti et al., 2011).

Se ha documentado que RpoS es inestable en condiciones de crecimiento exponencial y se vuelve estable al entrar en la fase estacionaria o en condiciones de estrés (McCann et al., 1993). La degradación de RpoS ocurre por el complejo ClpXP dependiente de ATP que contiene un núcleo proteolítico ClpP y de la proteína adaptadora RssB la cual es un miembro de la familia de reguladores de respuesta que contiene un aspartato que puede ser fosforilado por la molécula de acetil fosfato (Schlueder et al., 1996). La rápida degradación de RpoS depende del complejo ClpXP que depende de ATP (Flynn et al., 2003). Sin embargo, RpoS no es reconocido directamente por ClpXP, requiere un factor de reconocimiento específico, el regulador de respuesta de dos componentes RssB que se encarga de entregar a RpoS al complejo ClpXP (Muffler et al., 1996).

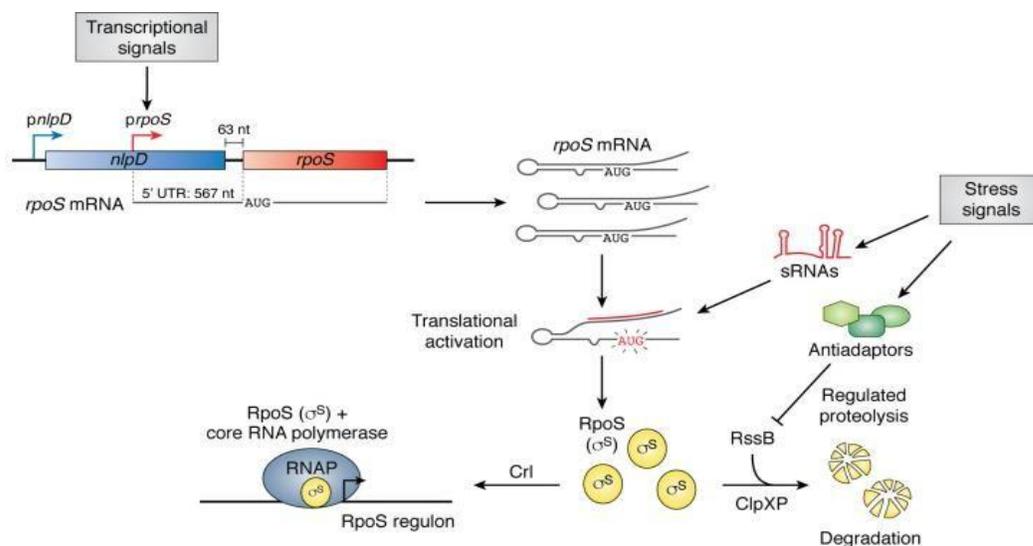


Figura 3. Múltiples niveles de regulación afectan la disponibilidad del factor sigma en respuesta a diversas señales ambientales en *E. coli*. Tomado de Gottesman et al., 2019.

Así, en *E. coli* la transcripción de *rpoS* es regulado positivamente por el sensor quinasa BarA, por los niveles intracelulares de cAMP y su proteína receptora CRP y por la guanosina 30,50-bispirofosfato (ppGpp) y UDP-glucosa. A nivel post-transcripcional por los ncARNs que favorecen la traducción del ARN, como DsrA, Arcz y RprA, y a nivel post-traducciona por RssB y ClpXP que controlan los niveles de la proteína.

Con respecto a *P. aeruginosa* solo se ha descrito la regulación a nivel transcripcional de RpoS por Vfr y PsrA. El regulador del factor de virulencia (Vfr) en *P. aeruginosa* es un factor de transcripción que se une al AMP cíclico (cAMP). La expresión de Vfr se controla a nivel de transcripción, la actividad de Vfr-cAMP está altamente integrada en numerosos sistemas regulatorios globales, incluida la señalización c-di-GMP, el sistema Gac / Rsm, la señal MucA/AlgU/AlgZR y Hfq/sRNAs. Vfr regula muchos genes relacionados con la virulencia, incluida la producción de exotoxina A, el sistema de detección *quórum* la biogénesis pilus tipo IV y el sistema de secreción tipo III (West et al., 2009; Davinic et al., 2009; Albus et al., 1997; Beatson et al., 2002).

Por otro lado, estudios han demostrado que en *P. aeruginosa* un regulador de la familia TetR llamado PsrA está involucrado en la regulación transcripcional inducida por fase estacionaria de *rpoS*. PsrA se une a los promotores *rpoS* y *psrA*, los cuales tienen secuencias palindrómicas (Kojic et al., 2001).

IV. ANTECEDENTES

En *P. aeruginosa* la regulación a nivel post-transcripcional involucra al sistema Rsm el cual está formado por cuatro pequeños ARNs no codificantes RsmV, RsmW, RsmY y RsmZ y dos proteínas de unión a RNA llamadas RsmA y RsmN que se unen a la región no traducida del ARNm y generalmente impiden su traducción, por lo cual se consideran reguladores negativos a nivel postranscripcional (Vakulskas et al., 2015).

En este proyecto se empleó la cepa ID4365 un aislado ambiental proveniente del Océano Índico, cuya característica principal es que sobre-produce piocianina en comparación con las cepas clínicas de referencia PAO1 y PA14 (Manwar et al., 2004). Recientemente se demostró que la delección del gen *rsmA* en esta cepa (IDrsmA) tiene como resultado la sobreproducción de piocianina, lo que indica que RsmA funciona como un regulador negativo de fenazinas. Por el contrario, se demostró que la sobreexpresión de *rsmA*,

desde un promotor constitutivo, da lugar a la reducción de piocianina (Cocotl-Yañez et al., 2020).

Debido a la alta producción de piocianina originada por la cepa IDrsmA, nuestro grupo de trabajo se ha centrado en determinar cuál es la respuesta protectora que evita el daño tóxico producido por la sobreproducción de esta fenazina y, particularmente, si RsmA controla dicha respuesta además de profundizar como RsmA controla la producción de piocianina. Un análisis proteómico preliminar mostró que hay un gran cambio en la expresión de los niveles de diversas proteínas en la mutante en *rsmA* en comparación con la cepa silvestre en condiciones de sobreproducción de piocianina. Interesantemente se incluyen proteínas relacionadas en la regulación de *rpoS* en diferentes niveles. Cabe mencionar que hasta ahora en *P. aeruginosa* no se ha documentado si existe una regulación entre RsmA y RpoS tal y como se ha reportado en otras especies bacterianas tales como *P. putida* (Hebb et al., 2004). Sin embargo, se ha reportado que la inactivación de *rpoS* así como la mutante en *rsmA* también tiene un incremento en la producción de piocianina (Sang et al., 1993).

Diferente a nuestro trabajo, mediante estudios de transcriptómica se ha reportado para la cepa *P. aeruginosa* PAK que RsmA incluye más de 500 genes, de los cuales aproximadamente un tercio se vieron afectados negativamente por una mutación *rsmA*, mientras que el resto se vieron afectados positivamente, a pesar de que son diferentes las técnicas empleadas se logra ver el gran efecto que tiene éste sistema de poder regular tanto positivamente como negativamente a una gran cantidad de genes (Brencic y Lory et al., 2009).

Por lo tanto, en el presente trabajo nos enfocamos en analizar de manera detallada el cambio de los niveles de las proteínas cuya expresión disminuye en la mutante en *rsmA* comparada con la cepa silvestre en condiciones de sobreproducción de piocianina. Adicionalmente determinamos si RsmA controla la expresión de RpoS y con ello la producción de esta fenazina.

V. HIPÓTESIS

RsmA controla la expresión de proteínas involucradas en la respuesta protectora ante la sobreproducción de piocianina y, adicionalmente, existe una cascada de regulación de RsmA sobre RpoS en la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ID4365, que impacta en la producción de piocianina.

VI. OBJETIVOS:

1.1. Objetivo general

Analizar el proteoma de la mutante en *rsmA* y validar experimentalmente si RsmA controla la expresión del factor sigma RpoS en *Pseudomonas aeruginosa* ID4365

1.2. Objetivos

1. Analizar las proteínas cuyos niveles disminuyen en la cepa IDrsmA en comparación con la cepa silvestre y agruparlas por su función.
2. Determinar si la expresión del factor sigma RpoS es regulado por la proteína RsmA y en qué nivel.
3. Determinar el efecto de la sobre-expresión de RpoS en la producción de piocianina en la cepa IDrsmA.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. Cepas bacterianas, plásmidos y medios de cultivo

Las cepas bacterianas y plásmidos empleadas en este estudio se enlistan en la tabla 1. Todas fueron crecidas rutinariamente en medio lisógeno (LB) o Protease Peptone-Glucose-Ammonium Salts (PPGAS) a 225 rpm e incubadas a 37 °C durante 24 horas. En los experimentos de ensayos de expresión se utilizó el medio PPGAS suplementado con arabinosa al 1%. Cuando fue requerido, el medio LB fue suplementado con los siguientes antibióticos para *E. coli*: tetraciclina (Tc) 15 µg/ml, estreptomicina (Sm) 30 µg/ml, ampicilina (Ap) 200 µg/ml; para *P. aeruginosa* Tc 120 µg/ml, Sm 200 µg/ml y (Cb) 200 µg/ml.

Cepa	Características	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ID4365	Tipo silvestre: aislado ambiental del Mar de Goa	(Manwar et al., 2004)
<i>Escherichia coli</i> DH5α	φ80Δ <i>lacZ</i> ΔM15Δ[<i>lacZYA-argF</i>]U169 <i>endA recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44</i> ; Cepa no patógena.	(Hanahan et al., 1983)Invitrogen
ID4365/pLP <i>rpoS</i>	Cb ^R ; cepa ID4365 que contiene la fusión transcripcional <i>rpoS-lacZ</i>	Este trabajo
ID4365/pLP <i>psrA</i>	Cb ^R ; cepa ID4365 que contiene la fusión transcripcional <i>psrA-lacZ</i>	Este trabajo
ID4365/pLP <i>rssB</i>	Cb ^R ; cepa ID4365 que contiene la fusión transcripcional <i>rssB-lacZ</i>	Este trabajo
ID4365/pLP <i>tig</i>	Cb ^R ; cepa ID4365 que contiene la fusión transcripcional <i>tig-lacZ</i>	Este trabajo
IDrsmA/pLP <i>rpoS</i>	Cb/Tc ^R ; cepa IDrsmA que contiene la fusión transcripcional <i>rpoS-lacZ</i>	Este trabajo
IDrsmA/pLP <i>psrA</i>	Cb/Tc ^R ; cepa IDrsmA que contiene la fusión transcripcional <i>psrA-lacZ</i>	Este trabajo
IDrsmA/pLP <i>rssB</i>	Cb/Tc ^R ; cepa IDrsmA que contiene la fusión transcripcional <i>rssB-lacZ</i>	Este trabajo

IDrsmA/pLPtig	Cb/Tc ^R ; cepa IDrsmA que contiene la fusión transcripcional <i>tig-lacZ</i>	Este trabajo
ID4365/pSEVrpoS	Sm ^R ; cepa ID4365 que contiene la fusión traduccional <i>rpoS'-lacZ</i>	Este trabajo
ID4365/pSEVpsrA	Sm ^R ; cepa ID4365 que contiene la fusión traduccional <i>psrA'-lacZ</i>	Este trabajo
ID4365/pSEVrssB	Sm ^R ; cepa ID4365 que contiene la fusión traduccional <i>rssB'-lacZ</i>	Este trabajo
IDrsmA/pSEVrpoS	Tc/Sm ^R ; cepa IDrsmA que contiene la fusión traduccional <i>rpoS'-lacZ</i>	Este trabajo
IDrsmA/pSEVpsrA	Tc/Sm ^R ; cepa IDrsmA que contiene la fusión traduccional <i>psrA'-lacZ</i>	Este trabajo
IDrsmA/pSEVrssB	Tc/Sm ^R ; cepa IDrsmA que contiene la fusión traduccional <i>rssB'-lacZ</i>	Este trabajo
Plásmidos	Características	Referencia
pLP170	Vector de clonación con resistencia a Cb	(Michael et al., 1997)
pUJ9	Vector de clonación con resistencia a Cb	(Lorenzo et al., 1990)
pSEVA	Vector de clonación con resistencia a Sm	(Silva-Rocha et al., 2012)
pLP _{rpoS}	Cb ^R ; fusión transcripcional <i>rpoS-lacZ</i> . Contiene 441 pb del 5'-UTR gen <i>rpoS</i> (sin incluir el RBS) clonados entre los sitios EcoRI-HindIII del vector pLP170.	Este trabajo
pLP _{psrA}	Cb ^R ; fusión transcripcional <i>psrA-lacZ</i> . Contiene 465 pb del 5'-UTR gen <i>psrA</i> (sin incluir el RBS) clonados entre los sitios EcoRI-HindIII del vector pLP170.	Este trabajo
pLP _{rssB}	Cb ^R ; fusión transcripcional <i>rssB-lacZ</i> . Contiene 445 pb del 5'-UTR gen <i>rssB</i> (sin incluir el RBS) clonados entre los sitios EcoRI-HindIII del vector pLP170.	Este trabajo

pLPtig	Cb ^R ; fusión transcripcional <i>tig-lacZ</i> . Contiene 452 pb del 5'-UTR gen <i>tig</i> (sin incluir el RBS) clonados entre los sitios EcoRI-HindIII del vector pLP170.	Este trabajo
pSEVrpoS	Sm ^R ; fusión traduccional <i>rpoS'-lacZ</i> . Contiene 465 pb del 5'-UTR del gen <i>rpoS</i> (incluye el RBS) clonados entre los sitios EcoRI-BamHI del vector pUJ9. Posteriormente digerido con NotI y subclonado en el mismo sitio del vector pSEVA.	Este trabajo
pSEVpsrA	Sm ^R ; fusión traduccional <i>psrA'-lacZ</i> . contiene 503 pb del 5'-UTR del gen <i>psrA</i> (incluye el RBS) clonados entre los sitios EcoRI-BamHI del vector pUJ9. Posteriormente digerido con NotI y subclonado en el mismo sitio del vector pSEVA.	Este trabajo
pSEVrssB	Sm ^R ; fusión traduccional <i>rssB'-lacZ</i> . Contiene 495 pb del 5'-UTR del gen <i>rssB</i> (incluye el RBS) clonados entre los sitios EcoRI-BamHI del vector pUJ9. Posteriormente digerido con NotI y subclonado en el mismo sitio del vector pSEVA.	Este trabajo
pRpoS	Plásmido araC-pBAD; <i>rpoS</i> inducible por arabinosa que expresa a <i>rpoS</i>	Montelongo-Martínez, 2022

1.2. Técnicas de manipulación de ADN

Todos los oligonucleótidos se diseñaron con base a los datos genómicos de la cepa ID4365 que se encuentran disponibles en la página de pseudomonas.com (Stover et al., 2000). Los fragmentos fueron amplificados mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) empleando las enzimas ADN polimerasa GoTaq® Flexi DNA (PROMEGA) y ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion Hot Start II (Thermo Scientific), utilizando ADN como molde a partir de la cepa ID4365 y purificados usando el sistema de ADN GeneJET (Thermo Scientific®). Los oligos se encuentran enlistados en la tabla 2, y su síntesis fue realizada en la Unidad de Síntesis y secuenciación de ADN (USSDNA) en el Instituto de Biotecnología, UNAM. La manipulación de ADN fue realizada de acuerdo a los métodos moleculares estándares en el laboratorio (Sambrook et al., 1987; Fillux & Ramos, 2014). La extracción de los plásmidos se realizó con el kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de acuerdo a las indicaciones del proveedor, se emplearon enzimas de restricción New England BioLabs y para las ligaciones se utilizó la enzima T4 DNA ligase (Promega). Todos los plásmidos se trabajaron en la cepa *E. coli* DH5α y se transformaron en *P. aeruginosa* ID4365 por electroporación como se ha reportado anteriormente (Cadoret, Soscia y Voulhoux, 2014; Fillux & Ramos, 2014).

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Oligonucleótido	Secuencia
FRposSUpE1	CTGAATTCTGGCCTGCGAC
FTRpoSDwnH3	CTAAGCTTTTCGACTCAAG
FPTRpoSDwnBH1	CGTGATCCTCCGGCCCTTC
FPsrAUpE1	CTGAATTCCAGGCCCTCAT
FtPsrADwnH3	CTAAGCTTTGACAAACACT
FtPsrADwnBH1	CTGGATCCCGTTTCGACGG
FRssBUpE1	CTGAATTCCTTCCAGTCCC
FtRssBDwnH3	CTAAGCTTACAGTGGGTCC
FptRssBDwnBH1	CTGGATCCAGCGTGGCAC
FTIgUpE1	CTGAATTCGGGCGGTGAG
FtTigDwnH3	CTAAGCTTTCCGGCTCCCA
p9Fw	CACGGAAATGTTGAATACT
p9Rv	GTGCATCTGCCAGTTTGA

1.3. Construcción de fusiones transcripcionales de pLP $rpoS$, pLP $psrA$, pLP $rssB$ y pLP tig

Para la construcción de las fusiones transcripcionales se amplificaron por PCR los fragmentos que corresponden a las regiones promotoras de los genes *rpoS* (441 pb), *psrA* (465 pb), *rssB* (445 pb) y *tig* (452 pb), cada secuencia fue amplificada con un par de oligonucleótidos específicos y enzima de alta fidelidad. Se empleó el plásmido pLP170 el cual es replicativo en *P. aeruginosa*, este vector contiene un marcador de resistencia a carbenicilina (Cb). Para cada fusión, los productos de PCR, así como del vector pLP170, se digirieron con las enzimas EcoRI y HindIII. Para la digestión, el ADN purificado fue tratado con las endonucleasas EcoR1 y HindIII utilizando el buffer 3.1 en un volumen final de 40 μ l que se incubó a 37 °C durante 2 h. Las regiones promotoras y el vector pLP170 fueron sometidos a reacciones de ligación en relación 1:3 (vector: inserto) en un volumen final de 20 μ l que se incubaron a 4 °C durante 16 h. La reacción de ligación fue movilizadada por choque térmico a la cepa *E. coli* DH5 α para su propagación. Posteriormente, las clonas de *E. coli* DH5 α fueron seleccionadas por su perfil de resistencia a Cb, los plásmidos fueron purificados y comprobados por ensayos de restricción y secuenciación de la región clonada. Posteriormente, se movilizaron a *P. aeruginosa* y se comprobó su presencia por reacciones de PCR, utilizando un oligonucleótido delantero específico (p9Fw) que reconoce la región de cada promotor clonada y un oligonucleótido reverso (p9Rv) que reconoce el gen reportero *lacZ*.

1.4. Construcción de fusiones traduccionales de pSEV $rpoS$, pSEV $psrA$ y pSEV $rssB$

Por otra parte, para la construcción de fusiones traduccionales se amplificaron fragmentos para *rpoS* (465 pb), *psrA* (503 pb) y *rssB* (495 pb), empleando oligonucleótidos específicos que abarcan la región promotora, el sitio de unión a ribosoma o Shine-Dalgarno (RBS o SD) y al menos 8 tripletes de cada gen estructural.

Para la construcción de fusiones traduccionales se empleó el plásmido pUJ9 este vector contiene un marcador de resistencia a Cb, que a diferencia del plásmido pLP170 no se replica en *P. aeruginosa*, por lo que se clonaron en este vector y posteriormente se subclonaron en el vector pSEVA el cual se replica en *P. aeruginosa*. Cada secuencia fue amplificada la región promotora de *rpoS*, *psrA* y *rssB* con un par de oligonucleótidos específicos y enzima de alta fidelidad. Para cada fusión, los productos de PCR, así como

del vector pUJ9, se digirieron con las enzimas EcoRI y BamHI.

Para la digestión, el ADN purificado fue tratado con las endonucleasas EcoR1 y BamHI utilizando el buffer 3.1 en un volumen final de 40 µl que se incubó a 37 °C durante 2 h. Las regiones promotoras y el vector pUJ9 fueron sometidos a reacciones de ligación en relación 1:3 (vector: inserto) en un volumen final de 20 µl que se incubaron a 4 °C durante 16 h. La reacción de ligación fue movilizada por choque térmico a la cepa *E. coli* DH5α para su propagación. Posteriormente, las clonas de *E. coli* DH5α fueron seleccionadas por su perfil de resistencia a Cb, los plásmidos fueron purificados y comprobados por ensayos de restricción y secuenciación de la región clonada.

Posteriormente se sub-clonaron en el vector pSEVA el cual se replica en *P. aeruginosa*, para la digestión, el ADN purificado fue tratado con la enzima Not-I y el buffer tango en un volumen final de 40 µl que se incubó a 37 °C durante 2 h. Las regiones promotoras y el vector pSEVA fueron sometidos a reacciones de ligación en relación 1:3 (vector: inserto) en un volumen final de 20 µl que se incubaron a 4 °C durante 16 h. La reacción de ligación fue movilizada por choque térmico a la cepa *E. coli* DH5α para su propagación. Posteriormente, las clonas de *E. coli* DH5α fueron seleccionadas por su perfil de resistencia a Sm, los plásmidos fueron purificados y comprobados por ensayos de restricción y secuenciación de la región clonada.

Finalmente, se movilizó aproximadamente 1 µg de cada plásmido a las diferentes cepas de *P. aeruginosa* ID4365 mediante el método de electroporación. Las clonas se seleccionaron por resistencia, y finalmente se comprobaron por reacciones de PCR, utilizando un oligonucleótido delantero específico (Fw) que reconoce la región de cada promotor clonado y un oligonucleótido reverso (p9Rv) que reconoce el gen reportero *lacZ*.

1.5. Protocolo de cuantificación de actividad β-galactosidasa

A partir de pre-cultivos en LB de las cepas seleccionadas se utilizó la cantidad de precultivo necesario para obtener una densidad celular inicial ($D.O_{600} = 0.05$) en matraces de 125 ml con 30 ml de PPGAS (pH 7.4) que se incubaron a 37 °C y 225 rpm, durante 24 h. A partir de alícuotas de 1 ml, se obtuvo la pastilla celular por centrifugación (14,000 rpm, 4 °C, 15 min), el paquete celular obtenido se lavó hasta su aclaramiento con PPGAS estéril, la pastilla se secó y mantuvo en hielo hasta su utilización. La determinación de la actividad β-galactosidasa se realizó como previamente se ha reportado (Miller J et al.,

1972). Brevemente, las células se resuspenden en 1 ml de buffer ZB ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM; KCl 10 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mM, pH 7.0, β -mercaptoetanol 50 mM), una alícuota de 200 μl se diluyen 1:5 con buffer ZB y se determina la absorbancia a 600 nm. Para el tratamiento celular, 200 μl de células resuspendidas en buffer ZB se añaden a un tubo nuevo de 2.0 ml que contiene 800 μL de buffer ZB, 10 μL de SDS 0.1% y 10 μL de cloroformo (por triplicado). Los tubos se cierran adecuadamente, se mezclan con vórtex durante 10 seg y se incuban a temperatura ambiente durante 5 min. La reacción se inicia al añadir 100 μL de orto-nitrofenil- β -galactósido (ONPG) (8 mg/ml) a cada tubo y se registra el tiempo inicial, después de observar la formación de color amarillo pálido la reacción se detiene con 500 μL de Na_2CO_3 1M (se registra como tiempo final). Posteriormente se mide la absorbancia a 420 nm y 550 nm para cada tubo, los valores se reportan en unidades Miller (MU), como previamente se ha reportado (Miller J et al., 1972).

Se realizan ≥ 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas cada una, a partir de las cuales se obtiene promedio \pm S.D. Para las comparaciones deseadas se realizó una prueba *t*-test no pareado de dos colas, con un valor de confianza del 95%. Las gráficas de barras y análisis estadístico se realizaron con GraphPad Prism 9.0.1®.

$$\text{Unidades Miller} = \frac{1000[A_{420} - 1.75(A_{550})]}{(t)(v)(D0600)}$$

1.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Graph Prism 6.0® (www.graphpad.com), en el cual se realizaron pruebas *t*-student, estableciendo un 95% de confianza con un valor de significancia de $P=0.05$. Por lo tanto, los datos con diferencia significativa tienen un valor de $P<0.05$ y se representan en las gráficas con asteriscos: $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**) y $P<0.001$.

1.7. Ensayos de expresión *rpoS*

Previamente se clonó el gen *rpoS* en el vector pHERD20T, el cual tiene un sitio de clonación múltiple (MCS) corriente abajo del promotor pBAD (Anexo I). La construcción obtenida araC-pBAD:*rpoS* fue clonada en el vector pSEVA421 en el sitio HindIII e introducida en las cepas ID4365 e IDrsmA por electroporación (Montelongo-Martínez LF, 2022). Las cepas se inocularon a una DO= 0.05 en matraces de 125 ml con 30 ml de PPGAS, cuando fue necesario las cepas se indujeron con arabinosa al 1% final y se cuantificó la producción de PYO siguiendo el procedimiento descrito por (Essar et al., 1990). Después de 24 horas los cultivos en PPGAS mostraron agregados y se procedió a cuantificar proteína mediante Branford. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

1.8. Extracción y cuantificación de piocianina

La piocianina se cuantificó como se ha reportado anteriormente, con algunas modificaciones (Essar et al., 1990). Para ello se realizó un pre-cultivo de 16 horas en medio LB a 37 °C a 250 rpm, suplementado con antibiótico si es el caso. Posteriormente, a partir de este pre-cultivo se inocularon matraces con 30 ml de medio PPGAS a una D.O. inicial de 0.05 sin antibiótico, se dejaron crecer por 24 horas a 37 °C. Después de 24 horas, los cultivos se centrifugaron (14,000 rpm por 10 minutos) y se guardaron los precipitados. Se tomaron 3 ml de cada sobrenadante por triplicado y se les adiciono un volumen de cloroformo. Se separó la fase orgánica y se acidifico con un volumen de HCl 0.2 M para obtener una solución rosa a partir de la que se obtiene la concentración de piocianina al medirla a una densidad óptica de 520 nm y multiplicarlo por el coeficiente de absorción molar de $17,072 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Los resultados son mostrados como piocianina/proteína.

1.9. Ensayos de Western blot

Las cepas se cultivaron en matraces de 125 ml con 30 ml de medio PPGAS (pH 7.4) a 37 °C y 225 rpm, durante 24 h. A partir de alícuotas de 5 ml, se obtuvo la pastilla celular por centrifugación, que se lavaron con 1 ml de MgSO₄ 10 mM estéril, para ser resuspendidas en 500 µl de amortiguador de lisis (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0) suplementado con mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche) y lisozima 0.8 mg/ml (concentración final). La suspensión celular se incubó 20 min a 30°C para ser sonicada dos veces a una amplitud del 40% durante 20 s, manteniendo las células en hielo para evitar el calentamiento. El lisado celular se centrifugó a 13000 rpm, 4°C por 20 min para obtener la fracción soluble, la cual fue transferida a un tubo de 1.5 ml. La concentración de proteína fue determinada por el método de Bradford. Una alícuota de 40 µg de proteína se mezcló con amortiguador de carga 1X SDS-PAGE y se calentó a 90°C por 10 min. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10% y transferidas a membranas de nitrocelulosa, las cuales fueron bloqueadas con 5% de leche descremada (Blotto Chem-Cruz, Santa Cruz Biotechnology) a 4 °C durante toda la noche.

La proteína RpoS fue detectada utilizando el anticuerpo policlonal contra RpoS de *Azotobacter vinelandii* (Muriel et al., 2017), diluido 1:4,000 en PBST (amortiguador de fosfatos, pH 7.4, 0.05% Tween 20). Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos anti-RpoS durante 90 min a temperatura ambiente. La detección se realizó con anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Abcam) diluido 1:5000 en PBST, que se incubaron durante 60 min a temperatura ambiente. Las membranas fueron reveladas con la solución NBT/BCIP (Thermo Scientific).

1.10 Análisis proteómico de las cepas IDrsmA e ID4365

El análisis de datos se realizó con Scaffold v5.0.1 Proteome Software (Searle et al., 2010), para obtener los datos normalizados del factor de abundancia espectral (NSAF) con valor FDR<0.05 (Vaudel et al., 2012; Kanehisa et al., 2019) los cuales se exportaron a Excel (Microsoft) para realizar las comparaciones deseadas. Se obtuvo el promedio y S.D. de tres réplicas independientes. Los niveles de proteínas se consideraron significativos, si el radio de los valores NSAF entre las condiciones evaluadas es $\geq |1.5|$ y $p < 0.05$ (*t-test* no pareado), las cuales fueron llamadas *differentially abundant proteins* (DAPs).

VIII. RESULTADOS

1.1. Análisis de los datos proteómicos de la cepa IDrsmA

A inicios del año 2021 se obtuvo y analizó el proteoma de la cepa IDrsmA vs ID4365 (Montelongo- Martínez LF, no publicado) a partir del cual se identificaron aproximadamente 1,400 proteínas. Dichas proteínas fueron sometidas a un análisis estadístico, las que mostraron diferencia significativa fueron representadas por un gráfico de volcán en dónde podemos apreciar las proteínas que son reguladas tanto negativamente como positivamente por *rsmA*, estas últimas son en las que se enfoca el presente proyecto y están representadas por color azul (Figura 4).

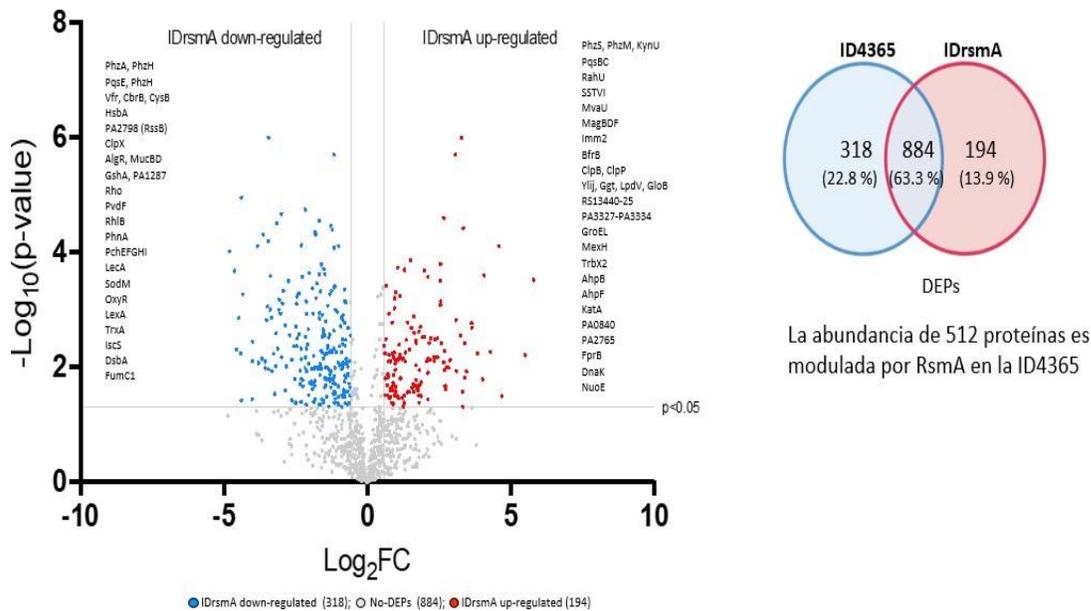


Figura 4: Diagrama de volcán que muestra el efecto de la inactivación de *rsmA* en la cepa ID4365. Los puntos azules representan las proteínas cuya abundancia disminuye en ausencia de RsmA, las cuales son reguladas positivamente por RsmA y los puntos rojos representan proteínas que aumentan en esta condición. Prom. ± S.D. de las réplicas, cambio de expresión Log₂FC>1.5, t-test, p<0.05.

Para profundizar en los mecanismos que le permiten a la cepa ID4365 contender contra la sobreproducción de PYO, realizamos la clasificación funcional con base en la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEEG) (Kanehisa et al., 2019) de las proteínas diferencialmente abundantes *differentially abundant proteins* (DAPs) cuyos niveles se modifican en la cepa IDrsmA comparada con la cepa ID4365 (Figura 5). Como se esperaba, la mayoría no han sido caracterizadas, sin embargo, de manera general en

la cepa IDrsmA disminuyen los niveles de DAPs que participan en procesos de transcripción, traducción, resistencia a antibióticos y movilidad, mientras que incrementan aquellas que participan en el metabolismo energético, síntesis de aminoácidos, cofactores, vitaminas, transportadores de carbohidratos y sustratos; así como DAPs que participan en la producción de metabolitos secundarios, sistemas de secreción, reparación del DNA, homeostasis redox, metabolismo de nucleótidos y degradación de xenobióticos. Encontramos una disminución en DAPs que participan en la regulación de RpoS, uno de los principales elementos que controla la respuesta contra el estrés oxidativo en *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Perfil de proteínas expresadas IDrsmA

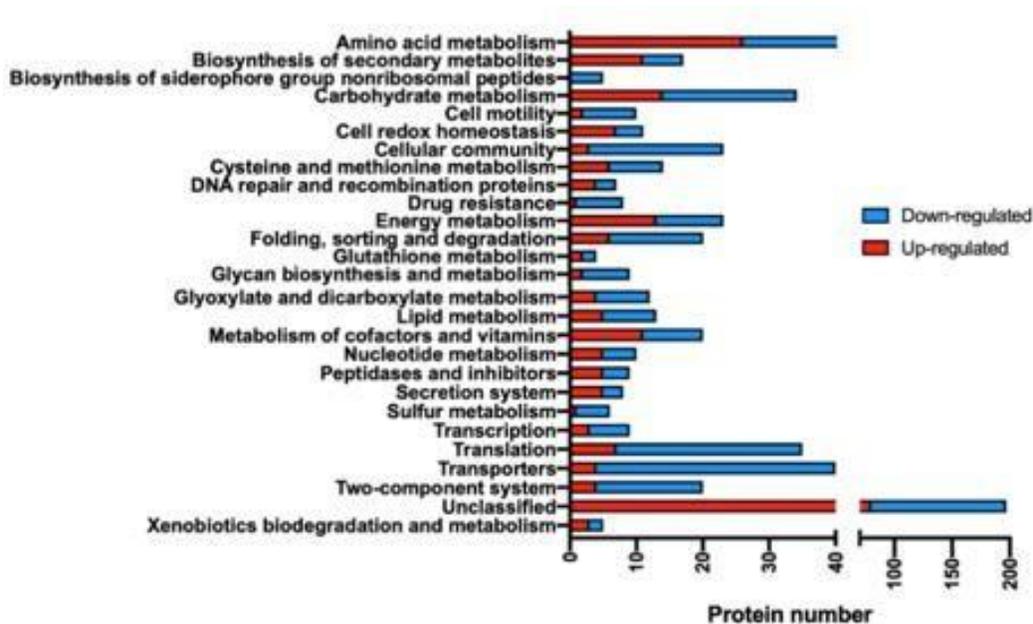


Figura 5: Clasificación KEEG de las DAPs controladas por RsmA en la cepa ID4365. Las columnas representan la cantidad de DAPs controladas por RsmA en la ID4365; así como su clasificación en diferentes procesos celulares de acuerdo a KEEG. DAPs que incrementan sus niveles (barras rojas), DAPs que disminuyen (barras azules) al inactivar a *rsmA*.

De estas proteínas encontramos algunas se encuentran relacionadas con la producción de fenazinas y otras relacionadas con la regulación de RpoS, las cuales se describen brevemente:

PhzH: Es una proteína que se encuentra relacionada con la producción de fenazinas. En cepas de *Pseudomonas* la conversión de PCA en PCN es catalizado por una glutamina

aminotransferasa codificada por *phzH*, el dominio N-terminal tiene un motivo que se conserva en las aminotransferasas de glutamina de clase II, el cual está presente en PhzH (Massiere y Badet 1998; Woeng et al., 2003). En la mutante IDrsmA los niveles de *phzH* disminuyen sugiriendo que todo el flujo de PCA se dirige hacia la producción de PYO.

ClpP: Forma parte del complejo proteolítico ClpXP, su función es catalizar la hidrólisis de sus proteínas blanco utilizando ATP y una chaperona ya sea ClpA o ClpXp que reconoce los sustratos, los desdobra y transloca al interior del canal proteolítico de ClpP para su degradación. La serina proteasa ClpP dependiente de ATP se encuentra altamente conservado en eubacterias e interactúa con sustratos a través de proteínas adaptadoras. (Maurizi et al., 1990)

RhIB: Proteína que se encuentra relacionada con la producción de ramnolípidos. Los ramnolípidos son una clase de biosurfactantes y son moléculas anfipáticas que les permite reducir las tensiones superficiales. Son ampliamente utilizados como detergentes, solubilizantes o agentes emulsionantes a nivel industrial ya se encuentra en campos el petróleo, la alimentación, la industria farmacéutica y agrícola (Vatsa et al., 2010; Paulino et al., 2016). *P. aeruginosa* se ha utilizado como cepa modelo para la biosíntesis de ramnolípidos por ser el productor más competente de estos compuestos (Ochsner et al., 1995). La producción de ramnolípidos involucra al operón *rhlABRI* el cual es regulado por el sistema Rhl (Feng et al., 2021). Además, se ha reportado que en la cepa IDrsmA disminuye la producción de ramnolípidos al reducirse los niveles de la proteína RhlR y por lo tanto la expresión del operón *rhlABRI* (Cocotl-Yañez et al., 2020).

MucD: Proteína que se encarga de la regulación de alginatos, en *P. aeruginosa*, *mucD* está situado por debajo de *algU* en lo que parece ser un operón *algUmucABCD* (De las Penas et al., 1997). Se ha documentado que mutaciones en *mucD* origina la producción de formación de colonias mucoides como consecuencia de la sobreproducción de alginato (Boucher et al., 1996). La formación para el fenotipo mucoide se debe a la pérdida de la función MucD, y se debe a señales de estrés produciendo la acumulación de proteínas mal plegadas o dañadas en el periplasma, originando una sobreproducción de alginato. Se ha reportado estas mutaciones en aislados provenientes de los pulmones de pacientes con infecciones crónicas y pacientes con fibrosis quística (Yorgey et al., 2001).

PchD y PchG

La infección por *P. aeruginosa* se documentó inicialmente en muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística, que mostraron una mayor expresión de los genes *pch* (Martín et al., 2011). *P. aeruginosa* produce dos sideróforos principales, la pioverdina (PVD) y lapioquelina (PCH). La producción de ambos sideróforos se encuentra regulada por la biodisponibilidad del hierro (Brandel et al., 2012). La pioquelina es un factor de virulencia importante, que actúa como un promotor del crecimiento durante la infección, los genes biosintéticos de PCH están organizados en dos operones, *pchDCBA* y *pchEFGHI*, y contribuyen a superar la respuesta de inanición de hierro del huésped durante la infección bacteriana (Ronnebaum et al., 2018).

Vfr

El regulador del factor de virulencia Vfr regula la producción de proteasas por *P. aeruginosa* y ejerce un efecto regulador global sobre la producción de múltiples factores de virulencia (West et al., 1994). Se ha demostrado que Vfr regula diferentes genes de QS (incluyendo a *lasR* y *lasB*), motilidad de contracción, biosíntesis flagelar y el factor sigma de fase estacionaria RpoS (Albus et al., 1997; Ambrosi et al., 2002; Bertani et al., 2003; Dasgupta et al., 2002). Mediante el análisis de microarreglos se identificó más de 200 genes regulados por Vfr incluyendo genes del sistema de secreción de tipo III, incluidos *exoS* y *exsA* (Wolfgang et al. 2003). Cabe mencionar que Vfr es ortólogo a la proteína represora del catabolismo (CRP) que regula a *rpoS* en *E. coli*.

PsrA

En estudios genéticos han identificado al regulador de la familia TetR llamado PsrA (26,3 kDa) relacionado en la regulación transcripcional de *rpoS* y en su auto regulación. Esta proteína se encuentra presente en *P. aeruginosa*, y se ha demostrado que se une a los promotores *rpoS* y *psrA* reconociendo secuencias palindrómicas con altos niveles de identidad (Kojic et al., 2001). Si bien en nuestros resultados se identificó un cambio en los niveles de PsrA, éste no fue significativo, pero es tomado en cuenta por que en estudios previos se ha demostrado que en *P. aeruginosa* PsrA está involucrado en la regulación transcripcional inducida por fase estacionaria de *rpoS*.

1.2. Comprobación de fusiones transcripcionales pLPrpoS, pLPpsrA, pLPprssB y pLPtig

Con el objetivo de evaluar si el efecto que ejerce el sistema RsmA sobre la expresión de genes que tienen que ver con la regulación de *rpoS* es a niveles transcripcional se construyeron fusiones transcripcionales de los genes *psrA*, *rssB*, *rpoS* y del operón *tig-clpP*. Las regiones promotoras de estos genes fueron clonadas en el vector pLP170 como se mencionó en materiales y métodos. Las construcciones fueron comprobadas por ensayos de restricción (Figura 6).

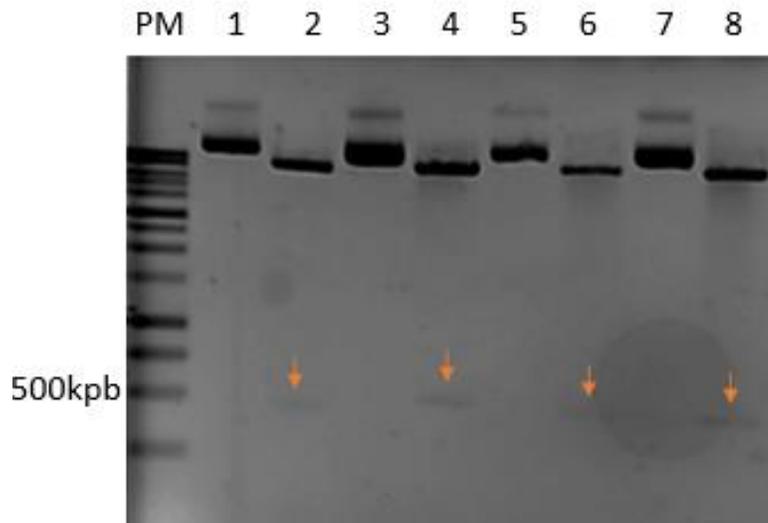


Figura 6. Ensayo de restricción utilizando las enzimas EcoR1 y HindIII, la flecha indica la liberación de los fragmentos clonados en gel de agarosa: 1) 1,3,5 y 7 plásmidos sin digerir; 2) pLPrpoS, 4) pLPpsrA; 6) pLPprssB; 8) pLPtig.

1.3. Movilización de las fusiones transcripcionales a las cepas ID4365 e IDrsmA.

Los plásmidos pLPrpoS, pLPpsrA, pLPprssB y pLPtig, así como el vector vacío pLP170 fueron transferidos por electroporación a la cepa ID4365 silvestre y la cepa IDrsmA. La presencia de las fusiones transcripcionales fue confirmada por reacciones de PCR utilizando un oligonucleótido directo reconoce la cada promotor clonado y un oligonucleótido reverso que reconoce el gen *lacZ* (Figura 7). De esta manera se obtuvieron las cepas silvestres: ID4365/pLP170, ID4365/pLPrpoS, ID4365/pLPpsrA, ID4365/pLPprssB, ID4365/pLPtig, así como las cepas: IDrsmA/pLP170, IDrsmA/pLPrpoS, IDrsmA/pLPpsrA, IDrsmA/pLPprssB e IDrsmA/pLPtig.

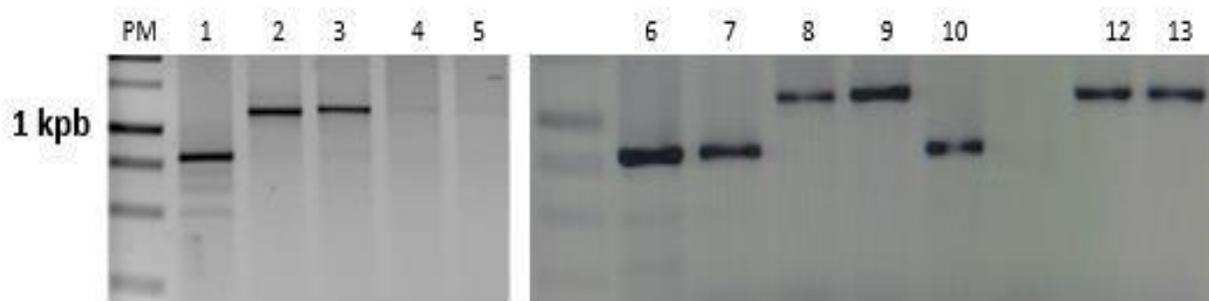


Figura 7. Identificación de las fusiones transcripcionales en las cepas ID4365 e IDrsmA mediante PCR. 1) pLP170 control negativo de reacción de PCR; 2) ID4365/pLPPrpoS, 3) ID4365/pLPpsrA, 4) IDrsmA/pLPPrpoS, 5) IDrsmA/pLPpsrA, 6) pLP170 control PCR, 7) ID4365/pLP170, 8) ID4365/pLPPrssB 9) IDrsmA/pLPPrssB, 10) IDrsmA/ pLP170, 12) ID4365/pLPtig, 13) IDrsmA/pLPtig.

1.4. Actividad de las fusiones transcripcionales

Para evaluar la actividad de las fusiones transcripcionales construidas para los genes implicados en la regulación de *rpoS* utilizadas en este proyecto, se cuantificó su expresión en las cepas ID4365 e IDrsmA en medio PPGAS, 24 horas a 37 °C a 265 rpm.

Como se observa en la figura 8, la actividad basal del plásmido pLP170 (utilizado inicialmente como control negativo) no cambia en ambas cepas. Por otro lado, la actividad de las fusiones pLPPrpoS y pLPtig no cambian entre la cepa ID4365 e IDrsmA. Mientras que la expresión de pLPPrssB incrementa al inactivar a *rsmA*, sugiriendo que RsmA controla de manera negativa la transcripción de *rssB*, probablemente de manera indirecta. De manera inesperada la actividad de la fusión pLPpsrA se abate al inactivar a *rsmA*, lo que sugiere una regulación positiva a nivel transcripcional de RsmA sobre *psrA*. Estos resultados demuestran que RsmA regula a nivel transcripcional la actividad de *psrA* y *rssB* de manera positiva y negativa, respectivamente. Sin embargo, este efecto no se refleja en la actividad de la fusión transcripcional pLPPrpoS.

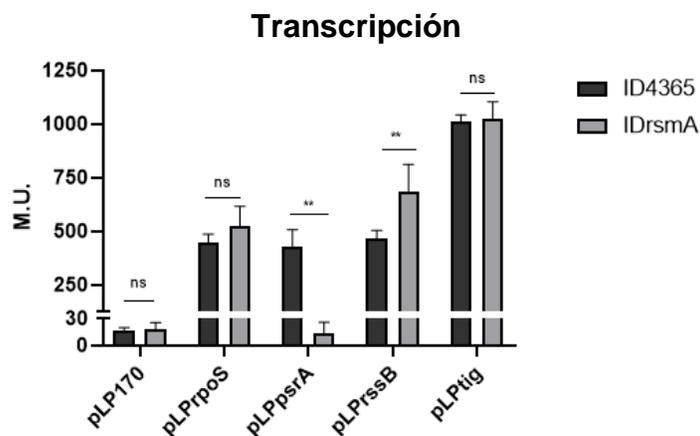


Figura 8: Actividad de las fusiones transcripcionales. Cada replica biológica se realizó al añadir por triplicado la cantidad de cultivo necesaria para llegar a una densidad celular inicial de $D.O.600=0.05$ los cuales fueron incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ en PPGAS con agitación, en estas condiciones de cultivo este valor de densidad celular corresponde a la fase logarítmica, ID4365/pLPrpoS ID4365/pLPpsrA, ID4365/pLPrssB, ID4365/pLPtig Se muestra el promedio de 3 réplicas biológicas \pm desviación estándar. Diferencia significativa *t*-student: (*, $P<0.05$); (**, $P<0.01$) y n.s.= no significativo.

1.5. Comprobación de fusiones traduccionales pSEVrpoS pSEVpsrA ypSEVrssB.

Con el objetivo de comprobar que los genes afectados a nivel transcripcional en la mutante en *rsmA* también se ven afectados en la traducción y determinar que aquellos cuya expresión no cambio a nivel transcripcional puedan verse afectados a nivel traduccional, sugiriendo una regulación directa por RsmA, se construyeron fusiones traduccionales para los genes *psrA*, *rpoS* y *rssB*. Las regiones reguladoras, el RBS y al menos 8 tripletes del gen estructural se fusionaron al reportero *lacZ*, como se mencionó en materiales y métodos. Las construcciones se comprobaron por patrón de restricción (Figura 9).

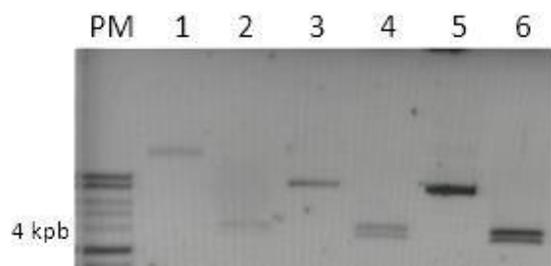


Figura 9: Ensayo de restricción de fusiones traduccionales *lacZ* subclonadas en pSEVA con la enzima NotI, liberación de los fragmentos clonados en gel de agarosa: 1) 1,3 y 5; plásmidos sin digerir; 2) pSEVrpoS, 4) pSEVpsrA 6) pSEVrssB,

1.6. Comprobación de la movilización de las fusiones traduccionales en *Pseudomonas aeruginosa*

Los plásmidos pSEVrpoS, pSEVpsrA y pSEVrssB, así como el vector vacío pSEVA fueron transferidos por electroporación a las cepas ID4365 e IDrsmA. La movilización de las fusiones traduccionales fueron confirmadas por reacciones de PCR utilizando un oligonucleótido directo que reconoce la cada promotor clonado y un oligonucleótido reverso que reconoce al gen *lacZ* (Figura 8). De esta manera se obtuvieron las fusiones pSEVrpoS, pSEVpsrA y pSEVrssB en la cepa silvestre y en la mutante en *rsmA*.

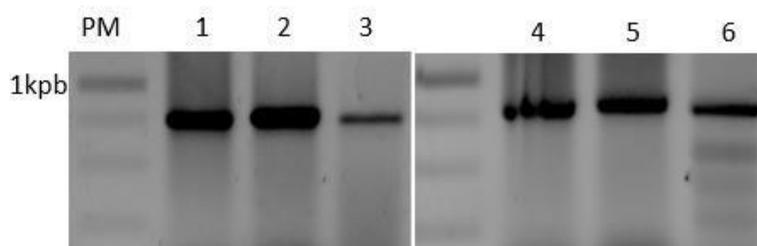


Figura 10: Comprobación de la movilización de las fusiones traduccionales a las cepas ID4365 e IDrsmA mediante PCR: 1) ID4365/ pSEVrpoS, 2) ID4365/pSEVpsrA, 3) ID4365/pSEVrssB, 4) IDrsmA/ pSEVrpoS, 5) IDrsmA/ pSEVpsrA, 6) IDrsmA/ pSEVrssB.

1.7. Actividad de las fusiones traduccionales

Con la finalidad de evaluar el efecto de RsmA a nivel post-transcripcional sobre los elementos de interés, se evaluó la expresión de las fusiones traduccionales en la cepa silvestre ID4365 e IDrsmA de las fusiones pSEVrpoS, pSEVpsrA y pSEVrssB. Las condiciones empleadas fueron las mismas que como se describió anteriormente para las fusiones transcripcionales. La actividad basal del plásmido pSEVA fue utilizado como control negativo, debido a que sus niveles de expresión no cambian en ambas cepas. Observamos que para la fusión pSEVrssB se activa considerablemente con respecto al valor basal del pSEVA, pero estas actividades se mantienen sin cambios entre ambas cepas. La actividad de las fusiones pSEVrpoS y pSEVpsrA disminuyen al inactivar a *rsmA*, lo que sugiere una regulación positiva por RsmA (Figura 11). Lo anterior sugiere que RpoS es regulado a nivel post-transcripcional por RsmA, probablemente de manera directa, ya que a nivel transcripcional no se modifica (Figura 8).

Traducción

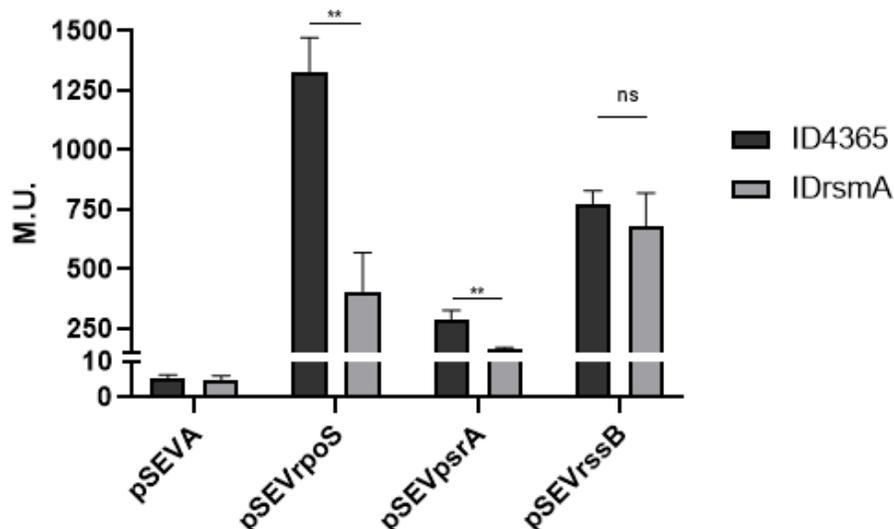


Figura 11: Actividad de las fusiones traduccionales. Cada replica biológica se realizó por triplicado iniciando el cultivo a una D.O.600=0.05 los cuales fueron incubados a 37 °C en PPGAS con agitación por 24 h. Se muestra el promedio de 3 réplicas biológicas \pm desviación estándar. Diferencia significativa *t*-student: (*, $P < 0.05$); (**, $P < 0.01$) y n.s.= no significativo.

1.8. Efecto de la sobre-expresión de *rpoS* en la cepa IDrsmA

Previamente se ha reportado que la inactivación de *rsmA*, así como la inactivación de *rpoS* (por separado) tienen como resultado la sobreproducción de piocianina en *P. aeruginosa* (Gabriela pessi et al., 2001; Sang et al., 1999). Además, en nuestros resultados *RpoS* es regulado de manera positiva por *RsmA* a nivel post-transcripcional lo que sugiere que en la cepa IDrsmA la sobreproducción de piocianina podría estar dada también por la baja expresión de *rpoS*, el cual actúa como un regulador negativo. Por lo tanto, se sobre-expresó a *rpoS* utilizando el plásmido pRpoS (Montelongo-Martínez LF, 2022) el cual fue movilizado a la cepa IDrsmA. De tal manera que, si *RsmA* controla a *rpoS*, entonces la sobreexpresión de *RpoS* disminuirá la producción de piocianina, en la cepa IDrsmA. Cabe resaltar que en este plásmido *rpoS* está clonado bajo el promotor pBAD, el cual es un promotor inducible con arabinosa. Como control negativo se utilizó el plásmido vacío pSEVA (Figura 12).



Figura 12: Ensayo de restricción utilizando la enzima HindIII, se muestra la liberación de los fragmentos en gel de agarosa: 1) 1 y 2 liberación del fragmento que contiene a *rpoS* clonado bajo el promotor *araC*, en el vector pSEVA, 3) pSEVA sin digerir.

1.8.1. Cuantificación de piocianina

Las cepas obtenidas anteriormente fueron crecidas en medio PPGAS por 24 h a 37 °C y 225 RPM con el objetivo de medir la producción de piocianina con y sin arabinosa al 1%. Debido a que los matraces mostraron agregación celular la piocianina se normalizó utilizando la concentración total de proteínas. En la Figura 13, se muestra que la sobreexpresión de *rpoS* inducida por arabinosa al 1% final (cepa IDrsmA/pRpoS), disminuye la producción de piocianina en la cepa IDrsmA, sin efecto del vector vacío (cepa IDrsmA/pSEVA). Este efecto solo se observa al inducir con arabinosa 1%. Los resultados confirman lo observado a nivel de la fusión traduccional *rpoS'-lacZ*, es decir existe una cascada de regulación positiva de RsmA sobre RpoS que se refleja a nivel de la producción de piocianina, la cual, no ha sido reportado con anterioridad.

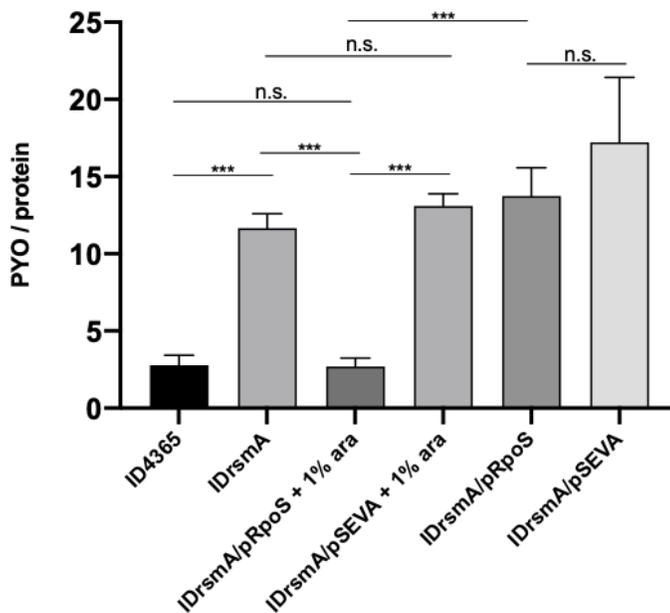


Figura 13: Efecto de la sobreexpresión de *rpoS* en la producción de PYO. Cada replica biológica se realizó al añadir por triplicado la cantidad de cultivo necesaria para llegar a una densidad celular inicial de D.O.600=0.05 incubados a 37 °C y 225 rpm. En estas condiciones de cultivo este valor de densidad celular corresponde a la fase logarítmica, ID4365, IDrsmA, IDrsmA/pRpoS+1% ara, IDrsmA+pSEVA+1%ara, IDrsmA/pRpoS y IDrsmA/pSEVA. 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.

1.8.2. La inactivación en *rsmA* reduce los niveles de la proteína RpoS.

Finalmente, y en colaboración con el Dr. Luis Felipe Muriel Millán, se realizó un ensayo de western blot utilizando anticuerpos anti-RpoS para detectar los niveles de esta proteína en las cepas ID4365, IDrsmA complementada con *rsmA* e IDrsmA con el plásmido vacío y como control negativo se utilizó a la cepa PAO1 mutante en *rpoS*. Como se observa en la figura 14, los niveles del factor sigma RpoS disminuyen en la mutante en *rsmA* con el plásmido vacío en comparación con la cepa silvestre ID4365. Además, estos niveles se restauran cuando la mutante es complementada con *rsmA* y como se esperaba, no se detecta a la proteína RpoS en la mutante *rpoS* de la cepa PAO1. En su conjunto nuestros datos demuestran que RsmA es un regulador positivo de la expresión del factor sigma RpoS y que controlando su expresión es capaz de modular la producción de piocianina.

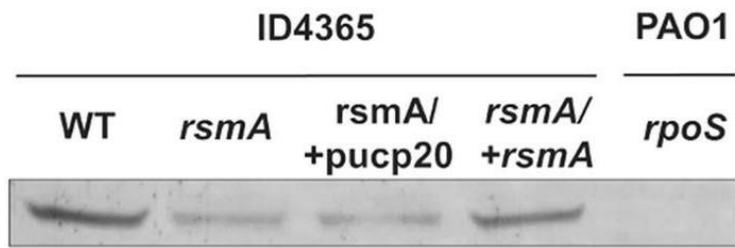


Figura 14. Western-Blot para identificar a RpoS

IX. DISCUSIÓN

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa que tiene la capacidad de poder infectar a una amplia diversidad de huéspedes ya que se encuentra en diversos ambientes y al producir metabolitos secundarios logra colonizar con gran facilidad. Uno de estos metabolitos es la piocianina una fenazina que produce radicales libres y ocasiona daño celular. La regulación de la producción de piocianina involucra diferentes sistemas y reguladores, incluidos los tres sistemas de detección de quórum Las, Rhl y Pqs, el factor sigma alternativo RpoS y el sistema regulador postranscripcional Rsm (Palleroni et al., 2015; Fang et al., 2021; Suh et al., 1999).

En este proyecto empleamos la cepa ID4365 cuya característica es que sobre produce piocianina y sabiendo que una mutación en *rsmA* aumentó su producción, surge la pregunta de saber cómo es que la bacteria se protege ante los efectos tóxicos de este compuesto.

Inicialmente este proyecto surge del análisis de proteómica ya que el sistema RsmA regula a nivel postranscripcional, afectando los niveles del producto final, las proteínas. Para esto se analizaron las proteínas cuyos niveles disminuyen en la cepa IDrsmA en comparación con la cepa silvestre y se agruparon por su función. De acuerdo a los resultados del proteoma encontramos que en la cepa IDrsmA disminuyen los niveles de 318 DAPs (Figura 4), la mayoría de las cuales son proteínas hipotéticas de acuerdo a KEEG (Figura 5).

Identificamos que en la cepa IDrsmA se abaten los niveles de Vfr, disminuye PsrA 0.6 veces ($p=0.238$), y los niveles de RpoS disminuyen 0.92 veces ($p=0.888$); sin embargo, estos cambios no son significativos, ni cumplen con los parámetros iniciales para considerarlos DAPs (nivel de cambio $\geq |1.5|$, $p<0.05$). Lo anterior nos llamó la atención debido a que RpoS es importante contra el estrés oxidativo. Aún más interesante, es que en *P. aeruginosa* la inactivación de *rpoS* fenocopia a la inactivación de *rsmA* al incrementar la producción de PYO, lo que en teoría incrementaría el estrés oxidativo (Chen et al., 2020; Wang et al., 2020).

Adicionalmente, dentro de las proteínas que son reguladas positivamente por RsmA se encuentran aquellas que están relacionadas con la regulación de *rpoS*.

En estudios previos con *P. aeruginosa* PAK se encontró que el regulón de RsmA incluye más de 500 genes, de los cuales aproximadamente un tercio se vieron afectados negativamente por una mutación *rsmA*, mientras que el resto se vieron afectados positivamente (Brencic y Lory et al., 2009). Estos datos van de acuerdo a lo que encontramos en el proteoma, ya que de las 512 proteínas por RsmA, 318 proteínas disminuyeron sus niveles mientras que 194 aumentaron, considerando que RsmA regula mayormente de manera positiva y muy probablemente de manera indirecta a estos blancos.

Dentro de las proteínas que disminuyen sus niveles en la mutante en *rsmA* son aquellos que tienen que ver con la síntesis de piochelina. Previamente se documentó que la expresión de los genes *pvd* y *pch*, que dirigen la biosíntesis de los sideróforos pioverdina y piochelina respectivamente se encuentran incrementados en la mutante *rsmA* en comparación con el tipo silvestre (Burrowes et al., 2006). De manera contraria en este trabajo encontramos que las proteínas que tienen que ver con la producción de piochelinas son reguladas positivamente por RsmA. Este efecto podría deberse a las características de las cepas una al provenir de un aislado ambiental y la otra al ser un aislado clínico, que a pesar de que comparten gran similitud de genes no se comportan de la misma manera, pudiéndose deber a la plasticidad del sistema de la bacteria para poder regular sus genes.

Debido a que varias proteínas relacionadas con la expresión de RpoS se modifican en la mutante en *rsmA* y que RpoS también funciona como un regulador negativo de la producción de piocianina (Chen et al., 2020), decidimos explorar si RsmA regula a este factor sigma alternativo. Si RsmA regula directamente a *rpoS* uniéndose al ARNm, se espera que el efecto de RsmA en la expresión de este gen se manifieste a nivel post-transcripcional. Para comparar el efecto de RsmA sobre la transcripción y traducción de *rpoS*, construimos fusiones transcripcionales y traduccionales de *rpoS*, y adicionalmente de sus reguladores como *psrA*, *rssB* y *tig* y medimos su expresión en la cepa silvestre ID4365 y la mutante IDrsmA, para determinar a qué nivel se encontraba la regulación por parte de RsmA en la expresión de *rpoS*.

Nuestros resultados demuestran que a nivel transcripcional *rpoS* no se vio afectado por la inactivación de *rsmA*, a pesar de que se observó una disminución de *psrA*, ya que se ha documentado que *PsrA* es el principal regulador transcripcional positivo de *rpoS*, por lo que esperábamos que fuera de la misma manera y disminuyeran ambos (Venturi et al., 2001; Kojic et al 2002). Sin embargo, nuestros resultados no muestran este comportamiento. Lo anterior sugiere que, a nivel transcripcional, la disminución de *psrA* en la cepa IDrsmA no afecta la transcripción de *rpoS*. Nuestros datos también mostraron un incremento de *rssB* a nivel transcripcional en la cepa IDrsmA, probablemente indique que haya más proteína y por lo tanto se esté degradando más RpoS.

Trabajos reportados indican que *rpoS* es regulado a nivel post-transcripcional por RsmA de manera negativa, esto sucede en la cepa *P. fluorescens* CHA0 (Heeb-Valverde et al., 2004). Sin embargo, observamos que a nivel de la traducción de *rpoS* los niveles se reducen en más de la mitad en la cepa IDrsmA en comparación con la cepa de tipo silvestre ID4365, lo que indica que RsmA regula positivamente la expresión de *rpoS*. Así, nuestros datos indican que RsmA controla la síntesis de PYO mediante la regulación de la expresión de RpoS, principalmente a nivel post-transcripcional.

Es importante destacar que en *P. putida*, RsmA reprime directamente la traducción de RpoS (Huertas et al., 2021), mientras que, de acuerdo a nuestros resultados en *P. aeruginosa* esta regulación es positiva, esto a pesar de que las regiones 5'-UTR poseen un 76.8 % de similitud. Generalmente, RsmA es considerado un represor postranscripcional ya que bloquea el sitio de unión al ribosoma (RBS) de diversos mRNAs, sin embargo, la regulación positiva también ha sido reportada, el mecanismo se basa en mejorar la estabilidad del transcrito ya sea favoreciendo conformaciones secundarias del mRNA que bloquean sitios de acceso a RNAsas y/o mejorando el acceso al RBS (Sobrero et al., 2020). Desde este punto de vista, sería novedoso determinar el mecanismo de regulación de RsmA sobre RpoS en *P. aeruginosa*.

Para confirmar que existe una cascada regulatoria en la que RsmA también controla la producción de piocianina a través de RpoS, evaluamos el efecto de la sobre-expresión de RpoS en la cepa IDrsmA sobre la producción de piocianina. Como se esperaba, la sobreexpresión de RpoS con 1% de arabinosa reduce los niveles de esta fenazina en la

cepa IDrsmA a los niveles silvestres, confirmando la existencia de la cascada de regulación RsmA-RpoS-Piocianina, que no ha sido reportada previamente.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de western blot utilizando anticuerpos policlonales contra RpoS de *Azotobacter vinelandii* (Muriel-Millán et al., 2017), ambas proteínas RpoS comparten un 88% de identidad y estos anticuerpos fueron capaces de detectar RpoS de *P. aeruginosa*. El ensayo de western blot se realizó utilizando extractos celulares de la cepa de tipo salvaje ID4365 y sus derivados. Como se muestra en la figura 14, los niveles de la proteína RpoS disminuyeron en la cepa IDrsmA y también en la cepa IDrsmA complementada con el plásmido vacío, en comparación con la cepa ID4365 de tipo salvaje. Como era de esperar, los niveles de proteína RpoS se restauraron en la cepa IDrsmA complementada con *rsmA*. Estos datos indican que RsmA es capaz de modular la expresión RpoS y por lo tanto coloca a RsmA como un regulador central de la síntesis de piocianina que controla tanto a los genes involucrados en su producción como a reguladores globales como RpoS que regulan también su síntesis.

Finalmente, parte de estos resultados han sido publicado en el artículo 'Unraveling the regulation of pyocyanin synthesis by RsmA through MvaU and RpoS in *Pseudomonas aeruginosa* ID4365' en la revista Journal of Basic Microbiology, en el cual participo como co-autor.

X. CONCLUSIONES

Los niveles de 318 proteínas disminuyen significativamente en la cepa IDrsmA.

RsmA regula a nivel transcripcional la expresión de *psrA*, de manera positiva y negativamente a *rssB*.

RsmA regula a nivel post-transcripcional la expresión de *rpoS*, de manera positiva.

La sobre-expresión de RpoS disminuye la sobreproducción de piocianina en la cepa IDrsmA, sugiriendo una cascada de regulación RsmA ---->RpoS ----| Piocianina.

XI. PERSPECTIVAS

Determinar si la regulación de RsmA sobre *tig-clpX* es a nivel post-transcripcional.

Evaluar si RsmA se une a la región reguladora de *rpoS*.

Elucidar la vía de regulación de RsmA sobre *psrA* y *rssA-rssB*.

Obtener la mutante *rpoS* en la cepa ID4365 y evaluar la producción de PYO

XII. REFERENCIAS

A Muffler. Fischer, D., Altuvia, S., Storz, G., Hengge-Aronis, R. (1996) The RssB response regulator controls the stability of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. EMBO J. 15, 1333y1339.

Abreu PMD, Farias PD, Paiva GS, Almeida AM, Vasconcelos P. Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital setting : a potential health hazard. BMC Microbiol. 2017;10:317e328[http://refhub.elsevier.com/S2352-3042\(19\)30017-0/sref12](http://refhub.elsevier.com/S2352-3042(19)30017-0/sref12)[http://refhub.elsevier.com/S2352-3042\(19\)30017-0/sref12](http://refhub.elsevier.com/S2352-3042(19)30017-0/sref12).

Afshari A, Pagani L, Harbarth S. Year under review 2011: critical care in infection,[http://refhub.elsevier.com/S2352-3042\(19\)30017-0/sref21](http://refhub.elsevier.com/S2352-3042(19)30017-0/sref21) 2012;16:242.

Albus AM, Pesci EC, Runyen-Janecky LJ, West SE, Iglewski BH. 1997. Vfr controls quorum detection in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 179:3928–3935. <https://doi.org/10.1128/jb.179.12.3928-3935.1997>. 26.

Ambrosi, C., Leoni, L. & Visca, P. (2002). Different responses of pioverdine genes to self-induction in *Pseudomonas aeruginosa* and the group *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*. Appl Environ Microbiol 68, 4122–4126.

Barakat, K.M., Mattarm, M.Z.; Sabae, S.Z.; Darwesh, O.M.; Hassan, S.H. production and characterization of bioactive pigment of pyocyanins by *Pseudomonas aeruginosa* marina OSh1. Beef. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. 2015, pp. 6, 933–943.

Baron, S.S.; Rowe, J.J. Antibiotic action of pyocyanin. Antimicrobial. Chemother Agents. 1981, 20, 814–820.

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

Battesti, A., Majdalani, N., and Gottesman, S. (2011) The General stress response mediated by RpoS in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Microbiol. 189 –213

Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL, Levesque RC, Mattick JS. 2002. Differential regulation of shrinkage motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 184:3605–3613. <https://doi.org/10.1128/jb.184.13.3605-3613.2002>.

Becker G, Hengge-Aronis R: What does a sigma-dependent promoter *Escherichia coli* do,

role of nucleotide promoter positions –13/–14 and region 2.5 of σ S. *Mol Microbiol* 2001, 39:1153-1165.

Becker, G., Klauck, E., Hengge-Aronis, R. (2000) The RssB response regulator, a recognition factor for sS proteolysis in *Escherichia coli*, may act as an anti-s factor S. *Mol. Microbiol.* 35, 657 and 666.

Bertani, I., Sevo, M., Kojic, M. & Venturi, V. (2003). Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of stationary phase sigma factor *rpoS/RpoS* in *Pseudomonas*. *Microbial Arc* 180, 264–271

Boucher, J.C., Martínez-Salazar, J., Schurr, M.J., Mudd, M.H., Yu, H., and Deretic, V. (1996) Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologues of serine protease HtrA. *J Bacteriol* 178: 511–523.

Chen, L., Xu, X., Fan, C., Zhang, R., Ji, Y., Yu, Z., Qu, H., Feng, Z., Chi, X., Cheng, S., & Ge, Y. (2020). Pip serves as an intermediate in RpoS-modulated *phz2* expression and pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial pathogenesis*, 147, 104409

Chin-A-Woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V., and Lugtenberg, B. J. J. (2003) . Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas germs*. *New Phytol.* 157, 503–523.

Dasgupta, N., Ferrell, E. P., Kanack, K. J., West, S. And. & Ramphal, R. (2002). *fleQ*, the gene encoding the main flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is dependent on sigma70 and is downregulated by Vfr, a homologue of the cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184, 5240–5250

Davinic M, Carty NL, Colmer-Hamood JA, San Francisco M, Hamood AN. 2009. Role of Vfr in the regulation of exotoxin A production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading)* 155:2265–2273. <https://doi.org/10.1099/mic.0.028373-0>.

De Britto, S.; Gajbar, T.D.; Satapute, P.; Sundaram, L.; Lakshmikantha, R.Y.; Jogaiah, S.; Ito, S.-I. Isolation and characterization of the nutrient-dependent pyocyanin of *Pseudomonas aeruginosa* and its coloring and agrochemical properties. *Sci. Rep.* 2020, 10, 1542.

De Las Penas, A., Connolly, L., and Gross, C.A. (1997) The sigma-mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is transduced by RseA and RseB, two

negative regulators of sigmaE. *Mol Microbiol* 24: 373–385.

Essar DW, Eberly L, Hadero A et al. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* 1990; 172:884–900.

Farrell MJ, Finkel SE. The growth advantage in the stationary phase phenotype conferred by *rpoS* mutations depends on the pH and nutrient environment. *J Bacteriol* 2003;185:7044–7052.

Flynn, J.M., Neher, S.B., Kim, Y.I., Sauer, R.T., Baker, T.A. (2003) Proteomic discovery of ClpXP protease cell substrates reveals five classes of ClpX recognition signals. *Mol. Cell* 11, 671e683.

G, Williams F, Hindle Z et al. The global post-transcriptional regulator RsmA modulates the production of virulence determinants and N-acylhomoserin lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bact* 2001; 183:6676–83.

G.W. Lau, H. Ran, F. Kong, D.J. Hassett, D. Mavrodi, *Pseudomonas aeruginosa*. Pyocyanin is critical for lung infection in mice, infecting. *Immune*. 72 (2004) 4275–4278, <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.4275-4278.2004>

Gaal, T., Ross, W., Estrem, S.T., Nguyen, L.H., Burgess, R.R., and Gourse, R.L. (2001), Promoter recognition and discrimination by EsigmaS RNA polymerase. *Mol Microbiol* 42: 939–954.

Gaby, W.L. Study of the dissociative behavior of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 1946, pp. 51, 217–234.

Gessard C. (1884). In the blue and green colorations of the cloths. *C.R. Acad. Sci. Hebd. Sessions*. 94:536-538.

Hall, S.; McDermott, C.; Anoopkumar-Dukie, S.; McFarland, A.J.; Forbes, A.; Perkins, A.V.; Davey, A.K.; Chess-Williams, R.; Kiefel, M.J.; Arora, D.; et al. Cellular effects of piocyanin, a virulence factor secreted from *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins* 2016, 8, 823.

Hassan, H.; Fridovich, I. Mechanism of antibiotic action of pyocyanin. *J. Bacteriol.* 1980, 141, 156–163.

Hassett, D.J.; Charniga, L.; Bean, K.; Ohman, D.E.; Cohen, M.S. *Pseudomonas*

aeruginosa Response to Pyocyanin: Resistance mechanisms, antioxidant defenses, and demonstration of a superoxide dismutase cofactored by Immune Infects Magnesa. 1992, pp. 60, 328–336.

Heeb, S., Valverde, C., Gigot-Bonnefoy, C., & Haas, D. (2005). Role of sigma stress factor RpoS in secondary metabolism controlled by GacA/RsmA and resistance to oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. FEMS Microbiol. Lett. 243, 251–258. doi:10.1016/j.femsle.2004.12.008

Helmann, J. D. (2019) sigma factors and transcription initiation selection in bacteria. Mol. Microbiol. 2019.

Hengge, R. (2008) The two-component network and the general stress factor sigma RpoS (sigma S) in *Escherichia coli*. Adv. Exp. Med. Biol. 631, 40 and 53.

Hengge-Aronis R: The overall stress response in *Escherichia coli*. In responses to bacterial stress. Edited by Storz G, Hengge-Aronis R. Washington, D.C.: ASM Press; 2000: 161-178.

Hense, B.A.; Schuster, M. Basic principles of bacterial autoinducer systems. Microbial. Mole. Biol. [2015], 79, 153–169.

J. Brandel, N. Humbert, M. Elhabiri, I. J. Schalk, G. L. Uno. Mislin y A.-M. Albrecht- Gary, Dalton Trans., 2012, 41, 2820–2834.

J. Elliott J, Simoska O, Karasik S, Shear JB, Stevenson KJ. Transparent carbon ultra microelectrode matrices for electrochemical detection of a bacterial warfare toxin, pyocyanin. Anal. Chemistry. 2017; 89 (12): 6285-9. doi: 10.1021/acs.analchem.7b00876.

Jayaseelan, S.; Ramaswamy, D.; Dharmaraj, S. Pyocyanin: Production, applications, challenges and new knowledge. World J. Microbiol. Biotechnol. 2014, 30, 1159–1168.

Jishage M, Ishihama A. Regulation of the synthesis of sigma subunits of RNA polymerase in *Escherichia coli*: intracellular levels of sigma 70 and sigma 38. *J Bacteriol* 1995;177:6832–6835.

Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K., & Tanabe, M. (2019). New approach to understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acid Research*, 47(D1), D590–D595.

Klauck, E., Lingnau, M., Hengge-Aronis, R. (2001) Role of the RssB response regulator in σ^S recognition and initiation of σ^S proteolysis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 40, 1381 and 1390

Kojic M, Aguilar C, Venturi V (2002) Member of the TetR family *psrA* binds directly to the promoters *Pseudomonas rpoS* and *psrA*. *J Bacteriol* 184:2324–2330

Kojic, M., and V. Venturi. 2001. Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a regulator of the TetR family. *J. Bacteriol.* 183: 3712–3720.

Kurashi, M. Studies on the biosynthesis of piocyanin (I): On the cultural condition for the formation of piocyanins. *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto University.* 1958, 36, 163–173.

Lamont IL, Martin LW. Identification and characterization of new synthesis genes of pioverdinah [http://refhub.elsevier.com/S2352-3042\(19\)30017-0/sref9](http://refhub.elsevier.com/S2352-3042(19)30017-0/sref9) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* 2003;149(4):833e842 [http://refhub.elsevier.com/S2352-3042\(19\)30017-0/sref9](http://refhub.elsevier.com/S2352-3042(19)30017-0/sref9).

Lange, R., and Hengge-Aronis, R. (1994) The cellular concentration of the σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.* 8, 1600–1612

Latifi, A., M. Foglino, K. Tanaka, P. Williams and A. Lazdunski. 1996. A hierarchical quorum detection cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to the expression of the statutory phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* 21:1137–1146.

Liu, M. Y., H. Yang and T. Romeo. 1995. The pleiotropic gene product of *Escherichia coli* *csrA* modulates glycogen biosynthesis through effects on mRNA stability. *J. Bacteriol.* 177:2663–2672.

Loewen PC, Hu B, Strutinsky J, Sparling R (1998) Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 44:707–717

M. Starkey, L.G. Rahme, Modeling the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* in host plants, *Nat. Protoc.* 4 (2009) 117–124

Manwar AV, Khandelwal SR, Chaudhari BL et al. Production of siderophores by a *Pseudomonas aeruginosa* marina and its antagonistic action phytopathogenic fungi. *Appl Biochem Biotechnol* 2004; 118:243–51

Martin, L. W.; Reid, D. W.; Sharples, K. J.; Lamont, I. *Pseudomonas* Siderophores in the sputum of cystic fibrosis patients. *BioMetals* 2011, 24, 1059-1067.

Massage, F., and Bathroom, D. M. 1998. The mechanism of the amidotransferases glutamine-dependent. *Mole Cell. Life Sci*

Maurizi MR, Clark WP, Kim SH, Gottesman S. ClpP represents a unique family of serine proteases. *J Biol Chem.* 1990;265(21):12546–52.

Mavrodi, D.; Bonsall, R.F.; Delaney, S.M.; Soule, M.J.; Phillips, G.; Thomashow, L.S. Functional analysis of genes for biosynthesis of piocyanin and phenazine-1-carboxamide of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 2001, pp. 183, 6454–6465.

Mavrodi, R.F. Bonsall, S.M. Delaney, M.J. Soule, G. Phillips, L.S. Thomashow, Functional analysis of genes for the biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1- carboxamide of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 6454–6465, <https://doi.org/10.1128/JB.183.21.6454-6465.2001>.

McCann, M. P., Fraley, C. D. and Mati, A. (1993) the alleged sigma factor KatF is regulated post-transnationally during carbon starvation. *J. Bacteriol.* 175, 2143–2149

Mesquita CS, Soares-Castro P, Santos PM. *Pseudomonas aeruginosa*: phenotypic flexibility and antimicrobial resistance. In *microbial pathogens and strategies to combat them: science, technology and education*. One. Méndez-Vilas, Ed.], being from the phylum Proteobacteria and the domain Bacteria.

Miguel Cocotl-Yáñez, Martín Paolo Soto-Aceves, Abigail González-Valdez, Luis Servin-González, Gloria Soberón Chávez. Regulation of virulence factors by quorum and Rsm detection systems in the marine strain *Pseudomonas aeruginosa* ID4365, a natural

mutant in R. Microbiology Letters, 367 (2020), <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa092>

Miller CL, Romero M, Karna SL et al. RsmW, *Pseudomonas aeruginosa* small RNA binding to non-coding RsmA regulated upwards under biofilm versus planktonic growth conditions. BMC Microbiol 2016; 4:155 p.m.

Miller, J. H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Michigan. 466 pp.

Moayedi, To.; Nowroozi, J.; Sepahy, A.A. Effect of fetal and adult bovine serum on pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and soil samples. Iran. J. Basic medicine. Sci. 2017, 20, 1331–1338.

Montelongo-Martínez Luis Fernando, Hernández-Méndez Cristina, Muriel-Millán Luis Felipe, Hernández-Estrada René, Fabián-Del Olmo Misael Josafat, González-Valdez Abigail, Soberón-Chávez Gloria, Cocotl-Yañez Miguel. Unraveling the regulation of pyocyanin synthesis by RsmA through MvaU and RpoS in *Pseudomonas aeruginosa* ID4365, an overproducer strain. Submitted article

Muller, M.; Merrett, S.F. The production of pyocyanins by *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to ionic silver. Antimicrobial. Chemother Agents. 2014, 58, 5492–5499.
Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Gallegos-Monterrosa, R., & Espín, G. (2017). EilA^{Ntr} non-phosphorylated induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Microbiology*, 104(2), 197–211.

NealsonKH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. Microbiology 1970;104:313–322

Oie S, Fukui Y, Yamamoto M, Masuda Y, Kamiya A. In vitro antimicrobial effects of aztreonam, colistin and the combination of 3 drugs of aztreonam, ceftazidime and amikacin on *Pseudomonas aeruginosa* producing metals b-lactamase. BMC Infects Dis. 2009;9:123.

Özcan, D.; Kahraman, H. Production of pyocyanins in the presence of calcium ions in *Pseudomonas aeruginosa* and recombinant bacteria. Turkish. J. Sci. Technol. 2015, 10, 13–19.

Özyürek, S.B.; Gür, S.D.; Bilkay, I.S. Investigation of the antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different clinical specimens.

Do. J. Biol. Chem. 2016, pp.16, 44.

P Yorgey , The roles of mucD and alginate in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in plants, nematodes and mice Molecular Microbiology (2001) 41(5), 1063–1076

Palleroni NJ. The history of *Pseudomonas*. Approximately. Microbial. 2010; 12 (6): 1377-83. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02041.

Paulino BN, Pessoa MG, Mano MCR, Molina G, Neri-Numa IA, Pastoregm Current state of biotechnological production and applications of glycolipid biosurfactants. Application Microbiol Biotechnol. 2016;100:10265–93.

Peix A, Ramirez-Bahia MH. Historical evolution and current state of the taxonomy of the genus *Pseudomonas*. Infect Genet Evol. 2009;9(6):1132e1147[http://refhub.elsevier.com/S2352-3042\(19\)30017-0/sref10](http://refhub.elsevier.com/S2352-3042(19)30017-0/sref10).

Pereira SG, Rosa AC, Cardoso O. Virulence factors as predictive tools of drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Virulence 2015;6 (7): 679-83. doi: 10.1080/21505594.2015.1048958.

Peterson, C. N., Ruiz, N., and Silflavy, T. J. (2004) RpoS proteolysis is regulated by a mechanism that does not require SprE (RssB) regulatory response phosphorylation of the site. J. Bacteriol. 186, 7403–7410

Priyaja, P.; Jayesh, P.; Philip, R.; Singh, I.S.B. Pyocyanin induced oxidative damage in vitro and its level of toxicity in human, fish and insect cell lines for selective biological application. Cytotechnology 2016, 68, 143–155.

Ren B, Shen H, Lu ZJ et al. PhzA2-G2 transcription exhibits RsmA-mediated direct activation in *Pseudomonas aeruginosa* M18, 2014.

Romeo, T. 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. Mole. Microbial. 29:1321–1330.

Romeo, T., M. Gong, M. I. Liu and A.-M. Brun-Zinkernagel. 1993. Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene of *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size and surface properties. J. Bacteriol. 175:4744–4755.

Ronnebaum, T. A.; Lamb, A. L. Non-ribosomal peptides for iron acquisition: pyochellin biosynthesis as a case study. *Curr. Think. Structure. Biol.* 2018, 53, 1-11.

S.A. Chugani, M. Whiteley, K.M. Lee, D. D'Argenio, C. Manoil, E.P. Greenberg QscR, a modulator of quorum detection signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc. Natl. Akkad. Sci. United States* 98 (2001) 2752–2757, <https://doi.org/10.1073/pnas.051624298>.

Scflweder, T., Lee, K.-H., Lomovskaya, O., and Matin, A. (1996) Regulation of the starvation sigma factor of *Escherichia coli* (σ S) by the protease ClpXP. *J. Bacteriol.* 178, 470 — 476.

Schellhorn, H. E. (2014). Clarifying the function of the RpoS regulation. *Future Microbiol.* 9, 497–507. doi: 10.2217/fmb.14.9

Schoental, R. The nature of the antibacterial agents present in *Pseudomonas pyocyanin* cultures. *Br. J. Exp. Pathol.* 1941, pp. 22, 137–147.

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

Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S., and Greenberg, E. Q. (2004). The regulon of *Pseudomonas aeruginosa* RpoS and its relationship with quorum detection. *Mol. Microbiol.* 51, 973–985. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003. 03886.x

Searle B. C. (2010). Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. *Proteomics*, 10(6), 1265–1269.

Sobrero, P. M., & Valverde, C. (2020). Comparative Genomics and Evolutionary Analysis of RNA-Binding Proteins of the CsrA Family in the Genus *Pseudomonas*. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 127.

Sterritt, O.W.; Lang, E.J.M.; Kessans, S.A.; Ryan, T.M.; Demeler, B.; Jameson, G.B.; Parker, E.J. Structural and functional characterization of the entry point to the biosynthesis of piocyanins in *Pseudomonas aeruginosa* defines a new subclass 3-deoxy-d-arabino-heptulosanate 7-phosphate synthase. *Biosci. Rep.* 2018, 38, BSR20181605.

Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, et al. Whole genome sequence of *Pseudomonas*

aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406(6799):959–964

Susan Gottesman¹ Problems Lie Ahead: Signaling Pathways That Regulate Overall Stress Responses in Bacteria Published, *Papers in Press*, June 13, 2019, DOI 10.1074/jbc.REV119.005593 Susan Gottesman¹, Molecular Biology Laboratory, Cancer Research Center, NCI, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20892 Edited by Ronald C. Wek.

Tamagnini, L.M.; Gonzales, R.D. Bacteriological and kinetic growth stability of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water. *J. Appl. Microbiol.* 1997, pp. 83, 91–94.

Tanaka K, Takahashi H (1994) Cloning, analysis and expression of an *rpoS* homologous gene of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Gen* 150:81–85

Tao Wu, Jie Xu, Wenjun Xie, Zhigang Yao, Hongjun Yang, Chunlong Sun and Xiaobin Li, *Pseudomonas aeruginosa* L10: Hydrocarbon degradation, biosurfactant producer and T-growth growth promoter endophyte plan isolated from a cane (*Phragmites australis*). *Microbiology published*: 25 May 2018 doi: 10.3389/fmicb.2018.01087

Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolutionary role of water outlets as a reservoir of the organism. *Am J Infect Contr.* 2009;33:S41eS49

Vakulskas CA, et al. Regulation of bacterial virulence by Csr systems (Rsm). *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 2015;79:193-224

Van Delden, C., and B. H. Iglewski. 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerge. Infects. Dis.* 4:551–560.

Vander Wauven C, Piérard A, Kley-Raymann M, Haas D. *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth in arginine: evidence of a group of four genes encoding the arginine desiminase pathway. *J. Bacteriol.* 1984; 160 (3): 928 to 34. PMID: PMC215798.

Vatsa P, Sanchez L, Clement C, Baillieul F, Dorey S. Rhamnolipid biosurfactants as new actors in the defense of animals and plants against microbes. *Int J Mol Sci.* 2010;11:5096–109. Vaudel, M., Sickmann, A., & Martens, L. (2012). Current methods for global proteome identification. *Expert review of proteomics*, 9(5), 519–532.

W.B. Whitman et al., Eds., *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Chichester, Reino Unido: John Wiley & Sons, Ltd, 2015.

Wang, K., Kai, L., Zhang, K., Hao, M., Yu, Y., Xu, X., Yu, Z., Chen, L., Chi, X., & Ge, Y. (2020). Overexpression of *phzM* contributes to much more production of pyocyanin converted from phenazine-1-carboxylic acid in the absence of RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of microbiology*, 202(6), 1507–1515

Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V.F., and Hengge, R. (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: genes dependientes de sS, promotores y selectividad del factor sigma. *J Bacteriol* 187: 1591-1603.

West SEH, Sample AK, Runyen-Janecky LJ. 1994. The product of the *vfr* gene, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the family of cyclic receptor proteins amp. *J Bacteriol* 176:7532–7542. <https://doi.org/10.1128/JB.176.24.7532-7542.1994>.

West, S. E., Kaye, S. A., Hamood, A. N. & Iglewski, B. H. (1994a). Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants that are deficient in exotoxin A synthesis and are altered in the expression of *regA*, a positive regulator of exotoxin A. *Infect Immun* 62, 897–903.

Williams P, Camera M. 2009. Quorum detection and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a history of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* 12:182–191. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.005>

Wolfgang, M.C., Lee, V. T., Gilmore, M. E. & Lory, S. (2003). Coordinate the regulation of bacterial virulence genes by a new signaling pathway dependent on adenylate cyclase. *Dev Cell* 4, 253–263.

Young, G. Pigment production and antibiotic activity in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J. Bacteriol.* 1947, 54, 109–117.

Zhang Y, Miller RM. Increased dispersion and biodegradation of octadecan by a rhamnolipid surfactant from *Pseudomonas* (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* 1992; 58:3276–82.

XIII. ANEXO

Construcción del plásmido pSEVA-rpoS

Una vez clonado *rpoS*, se diseñaron oligonucleótidos para obtener un fragmento de PCR que abarcara desde el gen *araC* hasta el extremo 3' del gen *rpoS* (PCR que contiene a *araC* y la fusión pBAD: *rpoS*), posteriormente se clonó en otro plásmido para poder integrar *araC* y pBAS: *rpoS* en el cromosoma de PA. De esta manera se controlan los niveles de expresión de *rpoS*, al estar clonado corriente abajo del promotor pBAD, el cual es activado por la proteína AraC en presencia de arabinosa (inductor).

La construcción de *araC*-pBAD: *rpoS* fue clonada en el vector pSEVA421, el cual tiene resistencia a estreptomicina, por lo que se puede utilizar en las cepas de PA (sensibles a estreptomicina).

