



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Papel del profago de *Pseudomonas aeruginosa* ID4365 en los colapsos poblacionales de su huésped”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
LIC. DANIEL HUELGAS MÉNDEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. RODOLFO GARCÍA CONTRERAS
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. PAULA LICONA LIMÓN
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

DR. MIGUEL COCOTL YAÑEZ
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

Ciudad Universitaria, CD. MX. Noviembre, 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.

HUELGAS MÉNDEZ DANIEL
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 12 de junio de 2023, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de Maestro en Ciencias, con la réplica de la tesis "Papel del profago de Pseudomonas aeruginosa ID4365 en los colapsos poblacionales de su huésped", dirigida por el/la Dr(a). GARCÍA CONTRERAS RODOLFO.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

BUSTAMANTE SANTILLÁN VICTOR HUMBERTO	PMDCBQ	PRESIDENTE
ALVAREZ ADRIAN FERNANDO	PMDCBQ	SECRETARIO
CEAPA CORINA-DIANA	PMDCBQ	VOCAL
JASSO CHÁVEZ RICARDO	PMDCBQ	VOCAL
MARÍA DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA	NO ACREDITADO	VOCAL

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 12 de junio de 2023



Coordinadora
Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

A mis padres

Adrián y María de la Paz

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por su apoyo mediante una beca nacional de maestría (09970).

A la DGAPA, PAPIIT-UNAM por el financiamiento IN200121 a través del cual se realizó este proyecto.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el financiamiento otorgado para asistir y presentar este proyecto en formato de cartel en el XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica del 16 al 21 de octubre de 2022 en Mérida, Yucatán.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco, en primer lugar, a Dios y a mis padres, Adrián Huelgas Fernández y María de la Paz Méndez Aranda, por ser los pilares en mi vida personal y profesional.

Al Dr. Rodolfo García Contreras, jefe del laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina de la UNAM por su confianza desde el inicio del proyecto y su guía durante su desarrollo hasta su culminación.

Al Dr. Daniel Cazares López, investigador postdoctoral en la Universidad de Oxford, por su confianza y guía durante todo el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Miguel Cócotl Yañez y la Dra Paula Licona Limón por su guía y consejos durante los exámenes de comité tutorial.

Al Dr. Luis David Alcaraz y la Dra Corina Diana Ceapã por su apoyo en los análisis bioinformáticos del proyecto.

A la Lic. Ana Lorena González Vadillo, la Dra Reyna Lara-Martínez y el Dr. Luis Felipe Jiménez García por su ayuda en la microscopía del fago aquí estudiado.

A los estudiantes de servicio social del Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina de la UNAM: Oswaldo Tostado Islas, Karen González García, Aldo Limones Martínez y Cristian Sadalis Santos López por su apoyo en la parte experimental del proyecto.

A mis compañeros de licenciatura, maestría, doctorado y posdoctorado del Laboratorio de Bacteriología: Katya Dafne Guadarrama Orozco, Juan Carlos García Cruz, Xareni Rebollar Juárez, Oswaldo Tostado Islas, Carlos Eduardo Hernández Cuevas, Mariel Hernández-Garnica, Giselle del Carmen Álvarez Cirerol, Ángel Yahir Estrada Velasco, Elizabeth Rosales Tecon, Diana Laura Marroquín Mendiola, Oswaldo P. Martínez, Miguel Ángel Díaz Guerrero y Enrique Peral por su ayuda y momentos compartidos durante el tiempo que estuve estudiando la maestría.

A mi familia y amigos en la ciudad de Puebla y Mérida, que, a la distancia durante el trabajo de maestría, también fueron y son parte esencial en mi vida.

ACTIVIDADES ACADÉMICAS REALIZADAS DURANTE LOS ESTUDIOS DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM)

Presenté el proyecto de investigación de la maestría en formato oral en el siguiente simposio:

- 1er Microsimposio Interinstitucional de Microbiología (2022, México).
"Profagos y colapsos poblacionales: distopía para un aislado marino de Pseudomonas aeruginosa".

En formato de cartel en los siguientes congresos:

- XXXIII Congreso Nacional de Bioquímica (2022, México) *"Papel del profago de la cepa de Pseudomonas aeruginosa ID4365 en los colapsos poblacionales por explotación de exoproteasas de su huésped"*
- Segundas Jornadas Latinoamericanas de Bacteriófagos (2022, Argentina)
"Role of the prophage of the P. aeruginosa strain ID4365 in population collapses due to the exploitation of exoproteases from its host"

Conté con una beca de la UNU/Biolac para asistir al siguiente curso de posgrado en la Universidad de Buenos Aires:

- "Los bacteriófagos: del genoma al metagenoma (Argentina, 2022)".

Conté con la beca de parte del "Sakura Science Program" para asistir al siguiente curso de posgrado en el Kyushu Institute of Technology:

- "Training of the next-generation sequencing techniques for the international research collaboration to solve global issues (Japón, 2023)

El presente trabajo fue publicado en la revista *FEMS Microbiology Ecology* el 26 de julio de 2023 y recibió la distinción de *Editor's choice*. Artículo disponible en:

<https://academic.oup.com/femsec/advance-article-abstract/doi/10.1093/femsec/fiad086/7231784>

ÍNDICE

1	Resumen	1
2	Resumen gráfico.....	2
3	Introducción	3
3.1	Sistemas de <i>quorum sensing</i> en <i>P. aeruginosa</i>	3
3.2	Exoproteasas de <i>P. aeruginosa</i>	6
3.2.1	Secreción de exoproteasas en <i>P. aeruginosa</i>	7
3.2.2	Medición de la actividad proteolítica de exoproteasas de <i>P. aeruginosa</i>	11
3.3	Explotación de exoproteasas y colapsos poblacionales en <i>P. aeruginosa</i>	12
3.2	Bacteriófagos	13
4	Antecedentes generales.....	19
5	Antecedentes directos	20
6	Justificación.....	22
7	Hipótesis.....	22
8	Objetivos	22
8.1	General.....	22
8.2	Particulares.....	22
9	Metodología	24
9.1	Esquema general de trabajo	24
9.2	Técnicas y procedimientos	25
9.2.1	Cepas y condiciones de crecimiento	25
9.2.2	Condiciones iniciales para experimentos de evolución <i>in vitro</i> en caseína.....	26
9.2.3	Evolución <i>in vitro</i>	27
9.2.4	Ensayos de competencia	27
9.2.5	Aislamiento y conservación de bacteriófagos	27
9.2.6	Titulación de bacteriófagos por técnica de doble agar	28
9.2.7	Purificación de placas líticas y preparación de stock intermedio de bacteriófagos	28
9.2.8	Preparación de ministock de bacteriófagos.....	29

9.2.9 Determinación de actividad caseinolítica.....	29
9.2.10 Determinación de producción de piocianina	30
9.2.11 Generación de cepas lisógenas	30
9.2.12 Extracción de DNA genómico, PCR y complementación.....	32
9.2.13 Secuenciación genómica	32
9.2.14 Análisis bioinformático	33
9.2.15 Microscopía electrónica	33
9.2.16 Análisis estadísticos	33
10 Resultados	34
10.1 Condiciones iniciales para experimentos de evolución <i>in vitro</i> en caseína.....	34
10.2 Ensayos de competencia	38
10.3 Identificación y aislamiento del profago de ID4365	40
10.4 Evolución experimental de ID4365 en caseína	42
10.5 Papel del fago Φ IDHM en el crecimiento y colapsos poblacionales de PAO1 <i>lasR</i>	48
11 Discusión	52
12 Conclusión.....	55
13 Perspectivas	56
14 Referencias	56

1 Resumen

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es una bacteria Gram-negativa presente en ambientes como el suelo y agua, que produce factores de virulencia regulados por sistemas de *quorum sensing* (QS). El QS es un comportamiento colectivo presente en las poblaciones bacterianas que funciona mediante la producción y detección de pequeñas moléculas difusibles. Existen tres sistemas principales de QS en *P. aeruginosa* conocidos como Las, Rhl y PQS. Entre los factores de virulencia de esta bacteria, regulados principalmente por los sistemas Las y Rhl, están las exoproteasas, las cuales son metabolitos costosos cuya producción es susceptible de ser explotada por variantes no productoras presentes en la población en un fenómeno denominado oportunismo social. La explotación de exoproteasas en *P. aeruginosa* ha sido estudiada en cepas de referencia como PAO1 y PA14. La evolución experimental de estas cepas durante su crecimiento continuo en caseína como única fuente de carbono ha demostrado que los no productores de exoproteasas, que son mutantes en el gen *lasR*, que codifica para el regulador LasR, son seleccionados y su acumulación en aproximadamente más del 75% lleva al colapso poblacional. Sin embargo, existen sistemas de detección de quórum no canónicos que han sido poco estudiados en donde el sistema Las no es el principal en la regulación transcripcional de exoproteasas. Además, muchos de los genomas de *P. aeruginosa* presentan profagos, cuya inducción genera costos metabólicos para su huésped por la síntesis de sus propias proteínas. La cepa ambiental ID4365 de *P. aeruginosa*, tiene una mutación sin sentido en el gen *lasR*, por lo que la expresión de exoproteasas está bajo el control transcripcional del sistema Rhl, y presenta un profago inducible. En este trabajo, se evaluó el papel de dicho fago temperado en los colapsos poblacionales de su huésped, en el contexto de la explotación de exoproteasas. Como se esperaba, las mutantes en *rhlR* de ID4365 se comportan como oportunistas sociales en ensayos de competencias y los individuos deficientes en exoproteasas se acumulan durante el crecimiento continuo en caseína. Además, en todos los cultivos ocurren colapsos poblacionales. Sin embargo, estos suceden también antes de que los oportunistas dominen. Durante el crecimiento en caseína se observó que el profago de ID4565 se indujo en un alto título antes de los colapsos poblacionales, lo que sugiere que, en la presencia de oportunistas sociales, este impone costos metabólicos adicionales en su población huésped, promoviendo así los colapsos. Además, la lisogenización de PAO1 mutante en *lasR* con este profago aceleró su colapso poblacional. Estos hallazgos destacan la influencia de los fagos temperados en el oportunismo social de exoproteasas de las poblaciones bacterianas.

2 Resumen gráfico

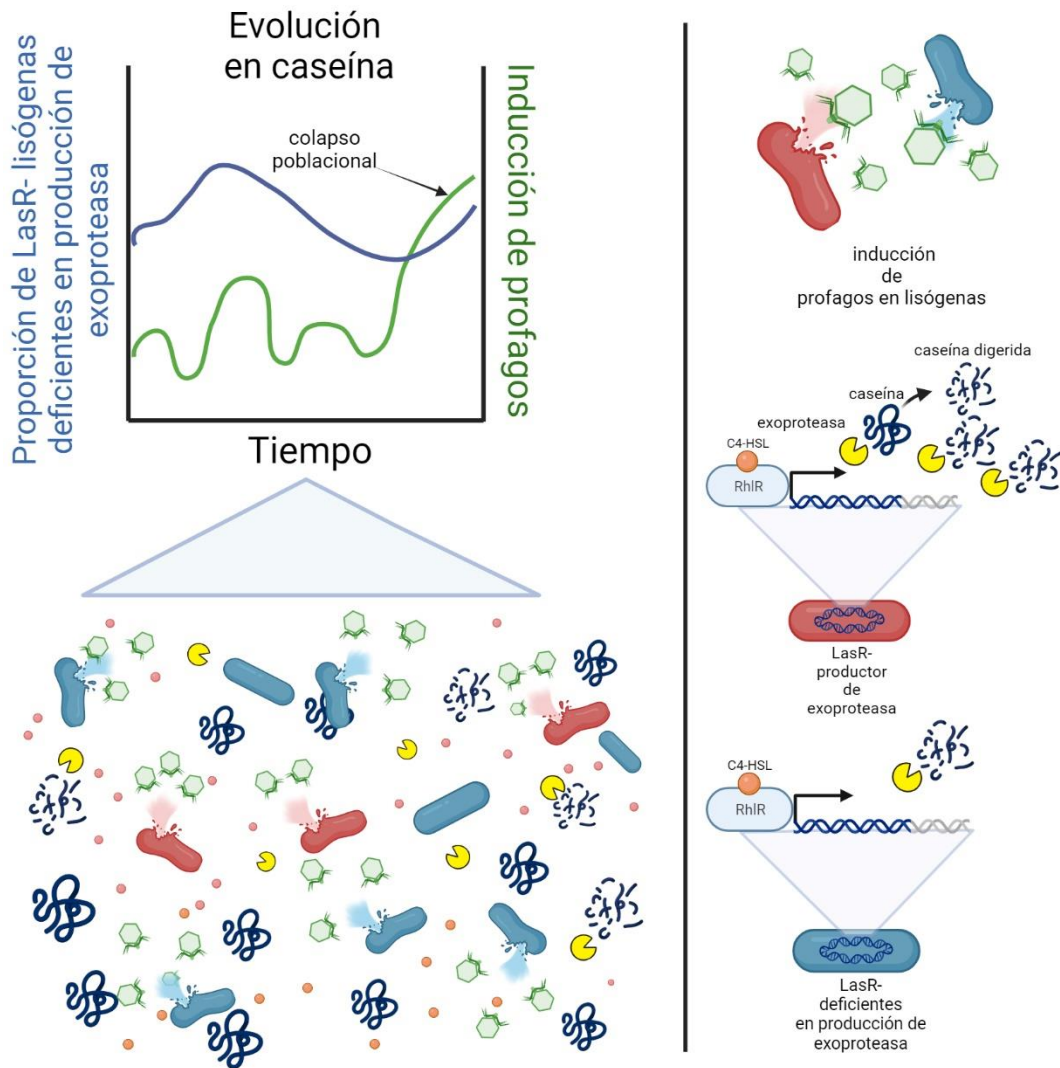


Figura 1. Resumen gráfico de las interacciones entre los individuos LasR⁺ lisógenos productores de exoproteasa e individuos LasR⁺ lisógenos con deficiencia en producción de exoproteasa en caseína como única fuente de carbono. En el gráfico se muestra que el aumento progresivo de la inducción de un profago en ambas subpoblaciones ocurre con el colapso de la población. Creado con BioRender.com

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, exoproteasas, oportunismo social, colapsos poblacionales, profagos.

3 Introducción

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es un bacilo Gram-negativo de amplia distribución ambiental y un patógeno oportunista capaz de causar una diversidad de infecciones. Actualmente es considerado uno de los tres patógenos prioritarios de relevancia crítica para la Organización Mundial de la Salud por sus altos niveles de resistencia a antibióticos y su virulencia (Badescu *et al.*, 2022).

Entre los múltiples factores de virulencia de esta especie, se encuentran las exoproteasas cuya función es la degradación de proteínas como la elastina (Liao *et al.*, 2022). La producción de exoproteasas en *P. aeruginosa* está regulada transcripcionalmente por los sistemas de comunicación célula-célula denominados sistemas de percepción de quórum o *quorum sensing* (QS) los cuales están interconectados y organizados jerárquicamente (Figura 2).

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

Los sistemas de QS en *P. aeruginosa*, Las y Rhl, poseen una proteína reguladora conocida como LasR y RhlR, codificadas por los genes *lasR* y *rhIR*, respectivamente, y una molécula señal difundible o autoinductor que corresponde a una homoserín lactona, denominada N-(3-oxododecanoíl)-homoserín lactona (C₁₂-HSL) y N-butil-homoserín lactona (C₄-HSL), codificadas por los genes *lasI* y *rhII*, respectivamente (Williams & Cámara, 2009). Una vez que los autoinductores llegan a una concentración mínima, se unen a su respectiva proteína reguladora causándole un cambio conformacional y activándola para funcionar como factor transcripcional (Jakobsen *et al.*, 2013). El sistema Las se encuentra canónicamente en la parte alta de la organización jerárquica de los sistemas de QS en *P. aeruginosa* y comienza la respuesta en cascada tras la activación de LasR por C₁₂-HSL. Dicha activación genera una retroalimentación positiva en la expresión del gen *lasI*, para la síntesis de más C₁₂-HSL, lo que genera una autoinducción del sistema Las y a su vez regula positivamente la expresión de *rhIR* y *rhII*. También, el complejo LasR: C₁₂-HSL activa la expresión de las exoproteasas LasA y LasB, la proteasa alcalina y otros factores de virulencia como la exotoxina A, cianuro de hidrógeno, entre otros. La expresión del gen *rsaL*, el cual se encuentra flanqueado por los genes *lasR* y

lasI, inhibe la expresión de *lasI* y por lo tanto, se disminuye la activación del sistema Las y Rhl (Nadal Jimenez *et al.*, 2012). Además, existe un tercer sistema llamado PQS basado en 4-alkilquinolonas (AQs) como la 2-heptil-3-hidroxi-4-(1*H*)-quinolona o *Pseudomonas quinolone signal* (PQS) en lugar de homoserín lactonas como molécula señal. El autoinductor PQS se sintetiza a partir de la conversión del antranilato a 2-heptil-4-hidroxiquinolona (HHQ) por acción de las enzimas PqsABCD. La HHQ es convertida a PQS por la PqsH monooxigenasa. PQS se une al regulador PqsR para activar directamente la expresión del operón *pqsABCD* y *phAB* involucrado en la síntesis de más molécula señal (PQS), generándose así una retroalimentación positiva. La proteína PqsE también puede interaccionar con RhlR y formar el complejo RhlR-PqsE:C₄-HSL, el cual activa la transcripción de factores de virulencia como la pirocianina, ramnolípidos, elastasa, LecA, cianuro de hidrógeno, entre otros. (Simanek *et al.*, 2022). Además, el gen *pqsR* y *pqsH* pueden ser activados transcripcionalmente por el complejo LasR-C₁₂-HSL y el complejo RhlR-C₄-HSL inhibe la transcripción de *pqsR* y del operón *pqsABCD*

(Figura2)(García-Reyes *et al.*, 2020; Jakobsen *et al.*, 2013).

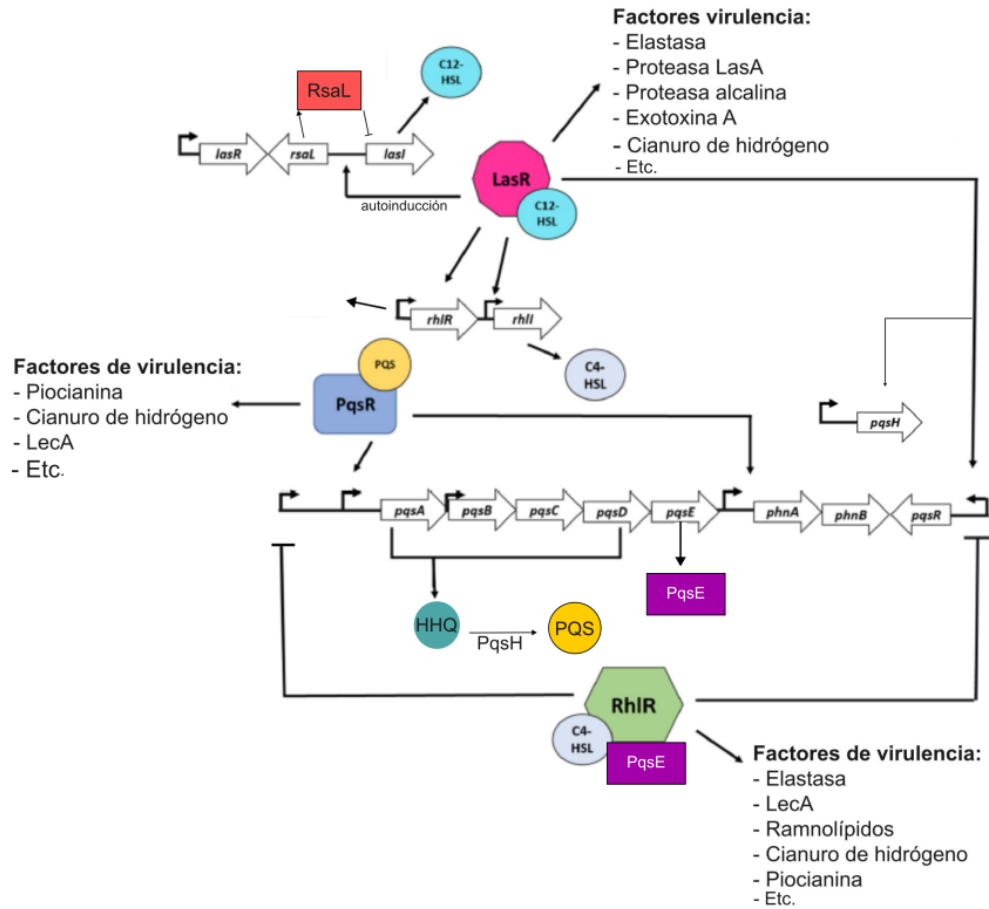


Figura 2. Diagrama que ejemplifica la interacción entre los 3 principales sistemas de QS en *P. aeruginosa*. El sistema Las, canónicamente está en lo alto de la jerarquía de estos sistemas y está formado por la proteína LasR y el autoinductor C₁₂-HSL, codificados por los genes *lasR* y *lasI*, respectivamente. El complejo LasR:C₁₂-HSL regula positivamente al gen *lasI*, generando una autoinducción del sistema Las, así como de los genes *rhIR* y *rhII* y activa la expresión de factores de virulencia como las exoproteasas: elastasa, proteasa LasA, la proteasa alcalina; la exotoxina A y cianuro de hidrógeno, entre otros. El sistema Rhl está formado por la proteína RhlR y el autoinductor C₄-HSL, codificados por los genes *rhIR* y *rhII*, respectivamente. Un tercer sistema de QS basado en aiquilquinolonas, es PQS. En este sistema las proteínas PqsABCD sintetizan HHQ el cual es convertido a PQS por la enzima PqsH. El complejo PqsR-PQS activa la expresión del operón *pqsABCD* y del operón *phnAB* lo cual provoca una retroalimentación positiva en la síntesis de mayor PQS. El complejo RhlR-PqsE:C₄- activa la expresión de factores de virulencia como la elastasa, LecA, ramnolípidos, cianuro de hidrógeno y piocianina. Por otro lado, el complejo LasR:C₁₂-HSL activa la expresión de *pqsR* y *pqsH* mientras que el complejo RhlR:C₄-HSL inhibe la expresión del operón *pqsABCD*.

operón *pqsABCD* y de *pqsR*. Las flechas indican regulación positiva y las barras T indican regulación negativa, las flechas dobladas indican promotores y las figuras de flecha indican la dirección de la transcripción del gen. LecA=Lectina A. Modificado de (García-Reyes *et al.*, 2020).

3.2 Exoproteasas de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa secreta al menos 7 exoproteasas que son conocidas como las elastasas LasA y LasB, la proteasa alcalina (AprA), la proteasa IV, la aminopeptidasa (PAAP o *Pseudomonas aeruginosa* aminopeptidase), la exoproteasa grande A (Large exoprotease A o LepA) y la proteasa pequeña (*Pseudomonas aeruginosa* small protease o PASP) (Filloux & Ramos, 2014; Jurado-Martín *et al.*, 2021).

Una de las más abundantes y considerada como uno de los factores de virulencia extracelulares principales es la elastasa B codificada por el gen *lasB* (Jurado-Martín *et al.*, 2021). Esta exoproteasa es capaz de degradar diferentes proteínas presentes durante su infección en las vías respiratorias, piel de pacientes quemados y queratitis como la elastina, proteína de la matriz extracelular presente en tejidos conectivos como los vasos sanguíneos y pulmones; colágeno, proteoglicano, inmunoglobulinas, fibrinógeno, citocinas entre otras proteínas de tejidos del huésped (Filloux & Ramos, 2014; Jurado-Martín *et al.*, 2021). Dada su alta abundancia en la mayoría de aislados de *P. aeruginosa*, al medir la actividad proteolítica de estos con sustratos como la azocaseína, se está midiendo, en gran parte, la actividad proteolítica de LasB (Filloux & Ramos, 2014).

Al igual que la elastasa A (Gambello & Iglewski, 1991), la proteasa IV (Nouwens *et al.*, 2003) y la proteasa alcalina (Gambello *et al.*, 1993), LasB está activada transcripcionalmente por el sistema Las y RhIR (Gambello & Iglewski, 1991). Además, el sistema PQS puede activar transcripcionalmente al gen de *lasB* de una forma indirecta a través de un mecanismo que aún se desconoce (García-Reyes *et al.*, 2020).

3.2.1 Secreción de exoproteasas en *P. aeruginosa*

Existen diversos sistemas de secreción a través de los cuales las exoproteasas de *P. aeruginosa* son secretadas hacia el medio extracelular como son: el sistema de secreción tipo I (SSTI), el sistema de secreción tipo II (SSTII) y el sistema de secreción tipo V (SSTV) (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

El SSTI es denominado sistema Apr en *P. aeruginosa* y está conformado por la proteína AprD (transportador ABC), AprE (adaptador) y AprF (proteína de membrana externa) y está involucrado en la secreción de la proteasa alcalina. El mecanismo a través del cual este sistema secreta a la proteasa alcalina es a partir del reconocimiento de una señal de secreción en el extremo C-terminal de AprA el cual es reconocido por el dominio de unión a nucleótido (NBD) de AprD lo cual causa un cambio conformacional en dicha proteína promoviendo la unión de la proteasa alcalina a AprD y la hidrólisis de ATP en el NBD. Estos cambios dirigen a la exoproteasa AprA a través del sistema de secreción hacia el medio extracelular (Bleves *et al.*, 2010)(Figura 3).

El SSTII es denominado como Xcp (extracelular protein) en *P. aeruginosa*, el cual es codificado por 11 genes organizados en dos operones diferentes: *xcpP* al Q y *xcpR* al Z. Entre las estructuras proteicas de este sistema que se encuentran en la membrana interna están la ATPasa XcpR la cual interactúa con XcpY formando un complejo de membrana interna con XcpZ y XcpS y una cuarta proteína de membrana interna, XcpP, la cual interacciona, al menos transitoriamente, con la proteína de membrana externa XcpQ (secretina) confiriéndole especificidad al sistema de secreción. La proteína XcpQ está ensamblada como multímeros de 12 subunidades formando una estructura con forma de anillo con una cavidad central de 90 Å de diámetro. Esta secretina constituye un canal grande a través del cual proteínas plegadas pueden pasar. Finalmente, 5 proteínas Xcp (XcpT-X) llamadas pseudopilinas. La pseudopilina mayor, XcpT es una estructura fimbrial llamada pseudopilus, la cual, junto con las 4 pseudopilinas menores (XcpU-X), forman un pistón el cual empuja a las proteínas a través de la secretina hacia el exterior de la célula bacteriana (Bleves *et al.*, 2010; Filloux, 2011)(Figura 3).

Las exoproteasas que secreta *P. aeruginosa* a través del SSTII son LasB, LasA y la proteasa IV (Figura 3). Estas exoproteasas no presentan ningún motivo linear conservado y son plegadas en el periplasma por lo que lo más probable es que el reconocimiento por este sistema de secreción sea conformacional (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

Cabe mencionar que los genes *xcp* y el de las exoproteasas que secreta están regulados por los sistemas Las y Rhl (Li & Lee, 2019).

Otro sistema de secreción involucrado en la secreción de exoproteasas en *P. aeruginosa* es el SSTV. El mecanismo de secreción en ese sistema es un proceso de dos pasos. Primero las proteínas cruzan la membrana interna a partir de la maquinaria de exportación de la vía Sec; luego, son transportadas a través de un canal de membrana externa formado por un dominio barril β . Finalmente las exoproteasas permanecen asociadas con la membrana externa o son liberadas hacia el espacio extracelular después de una actividad proteolítica. Existen dos tipos de SSTV, los autotransportadores (AT o SSTVa) y los de secreción de dos mitades (TPS o SSTVb) (Bleves *et al.*, 2010).

Los AT son capaces de llevar a cabo una autosecreción. Esas proteínas poseen diferentes dominios, uno de ellos situado en el extremo N terminal que consiste en un péptido señal, un dominio β formado por 12 láminas β en el extremo C terminal y en medio un dominio “viajero” que alberga un dominio catalítico. El péptido señal permite el transporte de la proteína a través de la membrana interna y luego es cortado. Una vez en el periplasma, el dominio del extremo C terminal se inserta en la membrana externa y forma un barril β dirigiendo el cual expone al dominio viajero en la superficie de la bacteria o la libera hacia el medio extracelular seguido de su escisión por medio de una autoproteólisis o por una proteasa. El único autotransportador caracterizado en *P. aeruginosa* es EstA y está involucrado en la producción de ramnolípidos (Bleves *et al.*, 2010)(Figura 3).

El mecanismo de TPS es muy parecido al de AT solo que el dominio viajero y β corresponden a dos proteínas independientes denominadas TpsA y TpsB, respectivamente. TpsA contiene un dominio de secreción TPS y un dominio

catalítico mientras que en TpsB el dominio β está precedido por uno o varios dominios POTRA (polipeptide transport-associated). Se ha propuesto que los dominios POTRA están involucrados en interacciones proteína-proteína, y en el caso de TpsB, en el reclutamiento de TpsA. TpsA y TpsB cruzan la membrana interna por el sistema Sec. TpsA es sintetizada como una pre-pro-proteína y es convertida a pro-proteína después de la maduración de su péptido señal. TpsB, se inserta en la membrana externa y recluta a TpsA a través de uno de sus dominios POTRA que interaccionan con el dominio TPS de TpsA. Una vez en la membrana externa, la pro-proteína TpsA lleva a cabo una escisión adicional lo que lleva a la maduración de TpsA en proteína, la cual permanece anclada a la superficie de la bacteria o liberada hacia el medio extracelular. En *P. aeruginosa* la exoproteasa LepA también es denominada como TpsA4 y es secretada a través de este mecanismo con ayuda de la proteína TpsB4 (LepB) (Bleves *et al.*, 2010)(Figura 3).

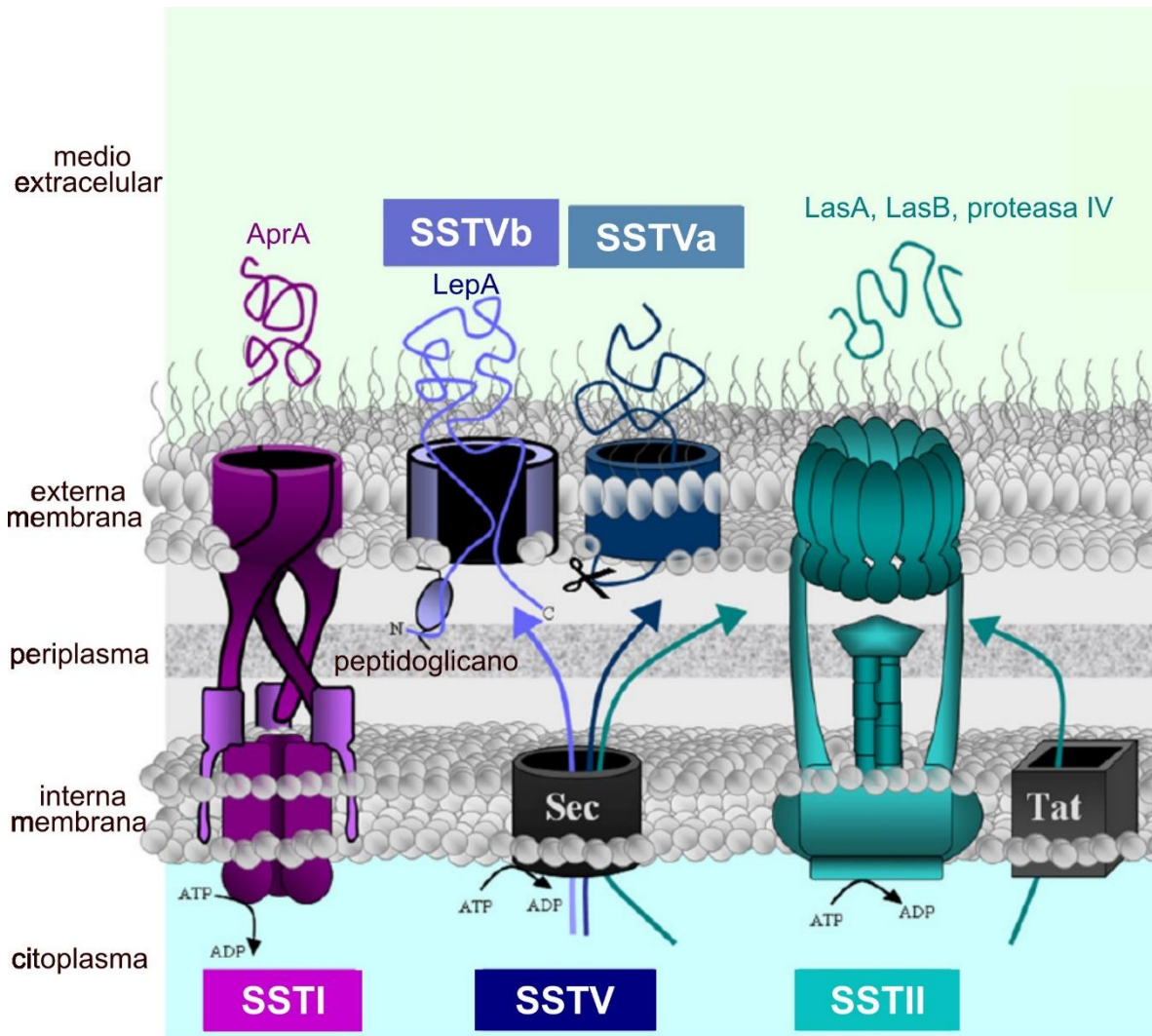


Figura 3. Sistemas de secreción de exoproteasas en *P. aeruginosa*. El transporte de exoproteasas a través de las membranas de *P. aeruginosa* se divide en las vías Sec-independiente o Sec/Tat-dependiente. Las exoproteasas secretadas por el SSTII y SSTV son primero exportadas hacia el periplasma por el sistema Sec o Tat antes de ser exportadas hacia la membrana externa por sus sistemas de secreción correspondientes. Por otro lado, el sistema de secreción tipo I toma a AprA directamente del citoplasma y la secreta hacia el medio extracelular. Modificado de (Bleves *et al.*, 2010).

3.2.2 Medición de la actividad proteolítica de exoproteasas de *P. aeruginosa*

Existen diversas maneras de evaluar la producción de exoproteasas de una cepa de *P. aeruginosa* mediante ensayos de actividad proteolítica como el ensayo de azocaseína, placas de agar con leche descremada (caseína) o zimografía con caseína (Filloux & Ramos, 2014).

Uno de los métodos utilizados en este estudio fue el ensayo de azocaseína. Este, a grandes rasgos, consiste en caseína impregnada de una tinción azo como sustrato. Esta al ser hidrolizada en los enlaces peptídicos internos por las proteasas presentes en la muestra, libera pequeños fragmentos a los cuales se les mide su absorbancia por ensayos colorimétricos después de la remoción del sustrato no digerido con ácido nítrico y centrifugación (Coêlho *et al.*, 2016; Filloux & Ramos, 2014).

La caseína es utilizada a menudo como sustrato debido a su alta sensibilidad a la proteólisis (Filloux & Ramos, 2014).

El nombre de las exoproteasas de *P. aeruginosa*, el gen que las codifica, su sistema de regulación de QS, su capacidad de digerir caseína y sus sistemas de secreción están resumidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Nombre, gen, sistema de regulación de QS, actividad caseinolítica y sistema de secreción de las exoproteasas de *P. aeruginosa*

Exoproteasa	Gen	Sistema de regulación de QS	¿Actividad caseinolítica?	Sistema de secreción	Referencia
Elastasa A (LasA)	<i>lasA</i>	Las/Rhl	X	SSTII	(Filloux & Ramos, 2014)
Elastasa B (LasB)	<i>lasB</i>	Las/Rhl	✓	SSTII	(Nouwens <i>et al.</i> , 2003)
Proteasa IV	<i>prpL</i>	Las/Rhl	✓	SSTII	(Nouwens <i>et al.</i> , 2003)
Proteasa alcalina (AprA)	<i>aprA</i>	Las/Rhl	✓	SSTI	(Nouwens <i>et al.</i> , 2003)

PASP (<i>P. aeruginosa</i> <i>small protease</i>)	<i>pasP</i>	ND	ND	ND	(Tang <i>et al.</i> , 2018)
LepA (<i>large</i> <i>exoprotease A</i>)	<i>lepA</i>	ND	✓	SSTV	(Kida <i>et al.</i> , 2008)
PAAP (<i>P. aeruginosa</i> <i>aminopeptidase</i>)	PA29 39	Las	ND	ND	(Nouwens <i>et al.</i> , 2003)

SSTI=Sistema de secreción tipo I, SSTII=Sistema de secreción tipo II, SSTV= Sistema de secreción tipo V, X = no posee actividad caseinolítica, ✓ = posee actividad caseinolítica, ND= no está demostrado.

3.3 Explotación de exoproteasas y colapsos poblacionales en *P. aeruginosa*

La producción de exoproteasas se caracteriza por ser un fenómeno cooperativo susceptible de explotación por parte de individuos no cooperadores, conocidos como cheaters u oportunistas sociales de exoproteasas. Estos cheaters se benefician de la hidrólisis de proteínas derivada de las exoproteasas secretadas por los productores, las cuales fungen como bienes públicos (Smith & Schuster, 2019). Con frecuencia estos oportunistas sociales aparecen en cultivos continuos al usar a la caseína como única fuente de carbono ya que el crecimiento en ese medio requiere de la producción de exoproteasas reguladas por QS como LasB y por lo tanto un comportamiento cooperativo entre los individuos de la población (Wilder *et al.*, 2011).

Los cheaters de exoproteasas se caracterizan por ser mutantes no funcionales del gen *lasR*, que, como se mencionó anteriormente, funge como regulador maestro del QS, regulando positivamente la expresión de exoproteasas, tales como las elastasas B, la proteasa alcalina, entre otras (Wilder *et al.*, 2011).

Cuando estos cheaters llegan a acumularse en más de un 75% en la población ocurre lo que se conoce como tragedia de los comunes, en donde la población cooperadora no es capaz de mantener más a la oportunista por el costo metabólico

que eso conlleva y el crecimiento de la población colapsa (Diggle *et al.*, 2007; Smith & Schuster, 2019).

No obstante, factores como una regulación a la baja de la producción de exoproteasa por parte de los cooperadores (Lai *et al.*, 2018) y la síntesis controlada de QS de metabolitos tóxicos que preferentemente inhiben el crecimiento de los oportunistas sociales, como la piocianina y los ramnolípidos (Castañeda-Tamez *et al.*, 2018; García-Contreras *et al.*, 2020), pueden estabilizar las poblaciones, lo que lleva a un equilibrio duradero entre cooperadores y oportunistas.

3.2 Bacteriófagos

Los bacteriófagos (o fagos) son virus que infectan exclusivamente a bacterias. Estos fueron primeramente descritos en publicaciones científicas por Frederick Twort en 1915 y Félix D'Herelle en 1917 (García-Cruz *et al.*, 2023).

A partir de las investigaciones en virología de fagos de DNA de doble cadena hechas por científicos como Delbrück, Luria, Hershey y Lwoff, la teoría coevolutiva y recientes avances tecnológicos (p. ej. secuenciación genómica, bioinformática y microscopía), se ha propuesto un modelo para contextualizar la naturaleza de las interacciones de los bacteriófagos con sus huéspedes bacterianos (Correa *et al.*, 2021). Este modelo propone que las interacciones virus-huésped se dan en un continuo de modalidades de infección los cuales están resumidos en la Figura 4.

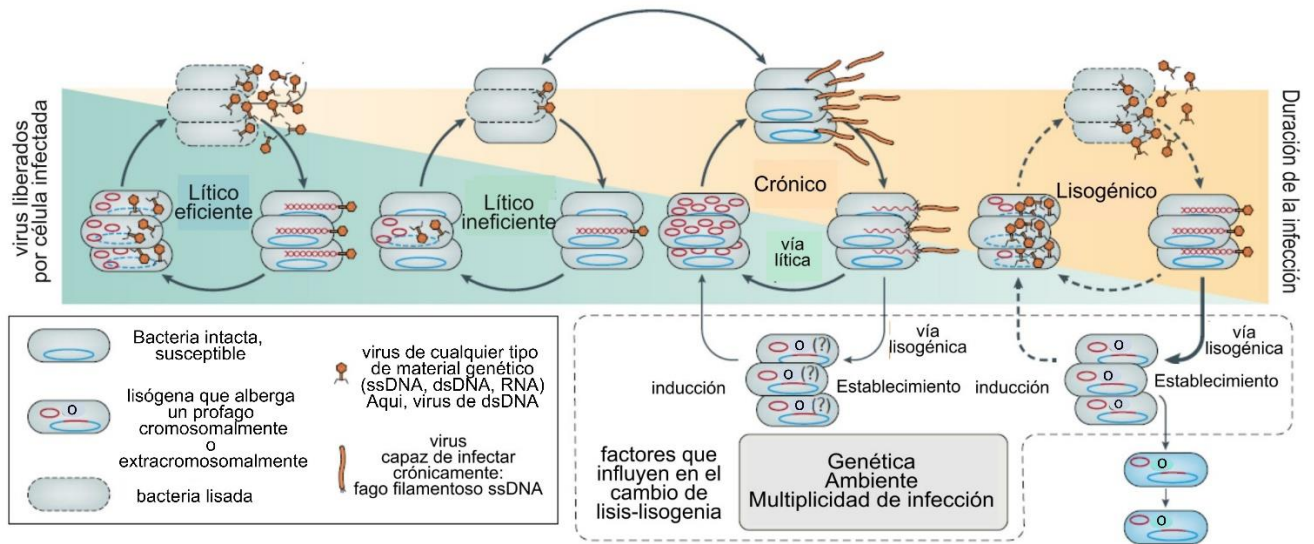


Figura 4. Modelo del continuo de modalidades de infección de los bacteriófagos. Los modos de infección de los fagos se dan en un continuo que va desde infecciones líticas eficientes dadas por fagos virulentos (extremo izquierdo de la figura) hasta infecciones lisogénicas persistentes por fagos temperados (extremo derecho de la figura; donde los fagos en el ciclo lisogénico, han integrado sus genomas al huésped convirtiéndose en profagos). El ciclo de infección crónico es parecido al lisógeno, con la diferencia de que, al liberarse las partículas virales, no ocurre una lisis del huésped, la duración de la infección es más corta, las partículas virales liberadas por célula infectada es mayor y la lisis del huésped no ocurre necesariamente. El ciclo lítico ineficiente, se caracteriza por tener una duración de infección más larga que en ciclo lítico eficiente, pero con menos partículas virales liberadas por célula infectada, por lo que varias células de la población permanecen sin ser infectadas dado que el proceso se detiene en algún punto del ciclo. Hay una fluidez entre el ciclo lítico ineficiente y el crónico dentro del continuo de modalidades de infección, y está dada, de nuevo, por la duración de la infección y la cantidad de virus liberados por célula infectada. Específicamente, los ciclos líticos eficientes son los más cortos y que producen la mayor cantidad de partículas virales por célula mientras que los ciclos lisógenos son los de mayor duración y los que producen menor cantidad de virus por célula (siempre y cuando no haya inducción de profagos). Muchos factores pueden influir tanto en el establecimiento de la lisogenia como en la inducción del ciclo lítico en los fagos temperados. Estos factores se relacionan con la célula huésped y el virus (genética, multiplicidad de infección), el ambiente (temperatura, pH, etc.). ds-DNA, DNA de doble cadena; ss-DNA, DNA de cadena simple. Modificado de Correa *et al.*, 2021.

Los fagos temperados pueden llevar a cabo dos modos de infección: lítico o lisogénico. En el modo lítico, estos fagos pueden comenzar a transcribir sus genomas y empaquetarlos en viriones que al lisar a la bacteria huésped son liberados de regreso al ambiente extracelular. En el modo lisógeno, los genomas de los fagos temperados permanecen como profago dentro de su huésped integrados al cromosoma o como un elemento extracromosomal (episoma) (Correa *et al.*, 2021).

Una bacteria lisógena, por lo tanto, son aquellas células bacterianas que albergan a un profago integrado en sus cromosomas o extracromosomalmente (Correa *et al.*, 2021).

El proceso de un ciclo de infección lisogénico procede en 3 pasos: primero, el establecimiento; segundo, el mantenimiento y tercero, potencialmente, la inducción (Howard-Varona *et al.*, 2017). Tomando como base el conocimiento del fago temperado más estudiado, el fago λ de *Escherichia coli*, se explicarán cada uno de estos pasos.

En λ , la “decisión” para entrar a lisogenia está dada por varios factores como: compatibilidad genética entre el fago y el huésped dados por los sitios de integración *attB* del genoma de la bacteria huésped que pueden recombinar con los sitios *attP* del genoma de λ ; el estado fisiológico del huésped (por ejemplo, la escasez de nutrientes puede promover la lisogenia) y la densidad del fago (por ejemplo, la multiplicación de infección alta (MOI), es decir, la relación entre cantidad de fagos por cada bacteria en la población, incrementa la lisogenia). La integración está dirigida a través de recombinasas que actúan en los sitios *attB*, del genoma bacteriano y *attP*, del genoma del fago, lo cual da especificidad. Sin embargo, los fagos también pueden integrarse de forma azarosa (por ejemplo, fago Mu) o no hacerlo y permanecer como episomas (por ejemplo, fago P1) (Howard-Varona *et al.*, 2017).

Una vez establecidos, los profagos se replican como parte del cromosoma bacteriano, mientras que los profagos extracromosomales requieren genes para la replicación de un plásmido (por ejemplo, ParA/ParB en P1). En λ , el mantenimiento del estado de lisogenia está dado en gran parte por el represor CI a través de un complejo circuito de retroalimentación genética (Howard-Varona *et al.*, 2017).

La activación del cambio lisis-lisogenia puede ocurrir espontáneamente a una baja frecuencia (10^{-8} a 10^{-5} por célula en λ) o como resultado de factores estresantes externos como aquellos que activan el sistema SOS de daño al DNA del huésped lo cual lleva a la inactivación de CI y la transcripción de genes asociados al ciclo lítico del fago temperado (Figura 5) (Nanda *et al.*, 2014). Estos factores estresantes

externos incluyen cambios en el pH, temperatura, nutrientes, exposición a antibióticos, peróxido de hidrógeno o agentes de daño al DNA (por ejemplo, radiación ultravioleta) (Correa et al., 2021).

Una vez inducidos, los profagos se replican episomáticamente (por ejemplo, λ , P1) o por transposición (por ejemplo, Mu). Luego, los viriones se ensamblan y son empaquetados con el genoma del fago vía endonucleasas que cortan al DNA en sitios específicos (por ejemplo, *cos*) o no específicos después de llenar la cápside (Howard-Varona et al., 2017).

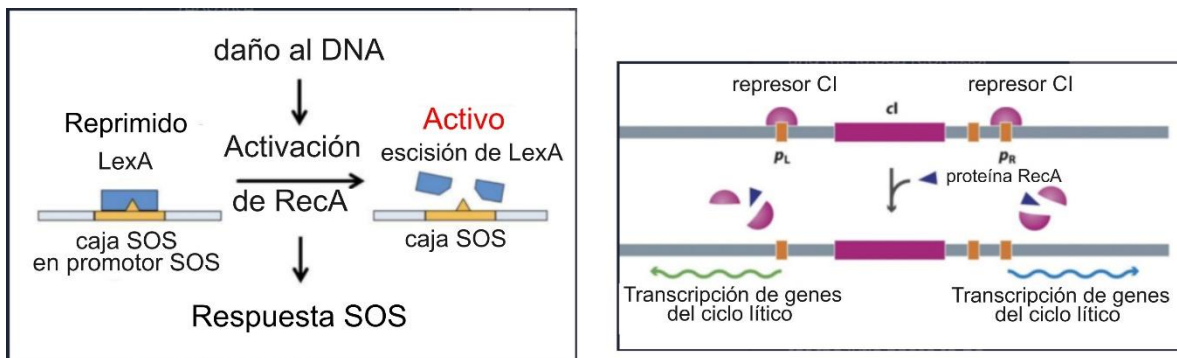


Figura 5. Inducción del fago λ durante la respuesta SOS de su huésped. La inducción de algunos profagos sigue el modelo del fago λ . Este mecanismo está regido por la respuesta SOS. Esta respuesta comienza al haber un daño en el DNA de la bacteria. Cuando este daño se presenta, la proteína RecA se polimeriza a lo largo del DNA de cadena simple en donde ocurrió el daño. En paralelo esta proteína activada cataliza la escisión de la proteína LexA, la cual está reprimiendo a más de 40 genes asociados a la respuesta SOS. El represor que mantiene el estado lisógeno en λ es denominado CI, el cual posee sitios de unión a RecA parecidos a los que posee LexA por lo que durante la respuesta SOS, CI se escinde de los sitios en el genoma del profago que están asociados a su programa lítico los cuales comienzan a transcribirse y el fago se escinde del cromosoma y comienza a empaquetar su genoma en los viriones ensamblados que salen hacia el espacio extracelular junto con la lisis de su huésped. P_L = promotor izquierdo, P_R =promotor derecho. Modificado de (Krebs, Goldstein & Kilpatric, 2011).

Una vez que el genoma del fago temperado permanece integrado al de su huésped como profago, la bacteria queda susceptible a la superinfección, es decir, la infección por otros bacteriófagos presentes. En esta situación en que la bacteria lisógena se encuentra expuesta a la superinfección de otros fagos, los fagos

temperados han desarrollado sistemas de inmunidad que pueden excluir dicha superinfección así como mecanismos de evasión de la misma (Bondy-Denomy et al., 2016; Mavrich & Hatfull, 2019).

Los sistemas de inmunidad de los fagos temperados son circuitos genéticos que controlan temporalmente la expresión de genes relacionada con el desarrollo del ciclo lítico y son elementos críticos en el ciclo de vida de estos fagos (Mavrich & Hatfull, 2019).

El fago λ , por ejemplo, posee los reguladores transcripcionales *cI* y *cro*. Durante la lisogenia, el represor C_I se une a operadores, es decir, sitios en el genoma que al que se une una proteína represora, que bloquean la transcripción inicial de *cro* la cual es requerida para el inicio del ciclo lítico (Mavrich & Hatfull, 2019).

La superinfección puede estar dada por bacteriófagos homoinmunes, es decir, cuando el represor producido por ambos fagos puede reprimir a ambos o heteroinmunes, cuando los fagos solo son sensibles a su propio represor (Figura 6).

Por ejemplo, si el fago λ inyecta su genoma hacia el interior de una cepa lisógena de λ , el represor C_I reconocerá los sitios operadores del genoma de λ y se reprimirá la expresión de genes relacionados al ciclo lítico. Además, el fago λ no solo puede de conferir inmunidad a su huésped contra otros fagos λ lo puede hacer también contra fagos homoinmunes como HK97 ya que el represor C_I de λ puede también reconocer sitios operadores de la expresión de genes líticos de HK97 (Mavrich & Hatfull, 2019).

Por otro lado, los fagos heteroinmunes 434 y λ poseen los reguladores *cI* y *cro* pero su represor C_I presenta especificidad por diferentes secuencias en el operador por lo que son incapaces de bloquear al gen *cro* del otro (Mavrich & Hatfull, 2019).

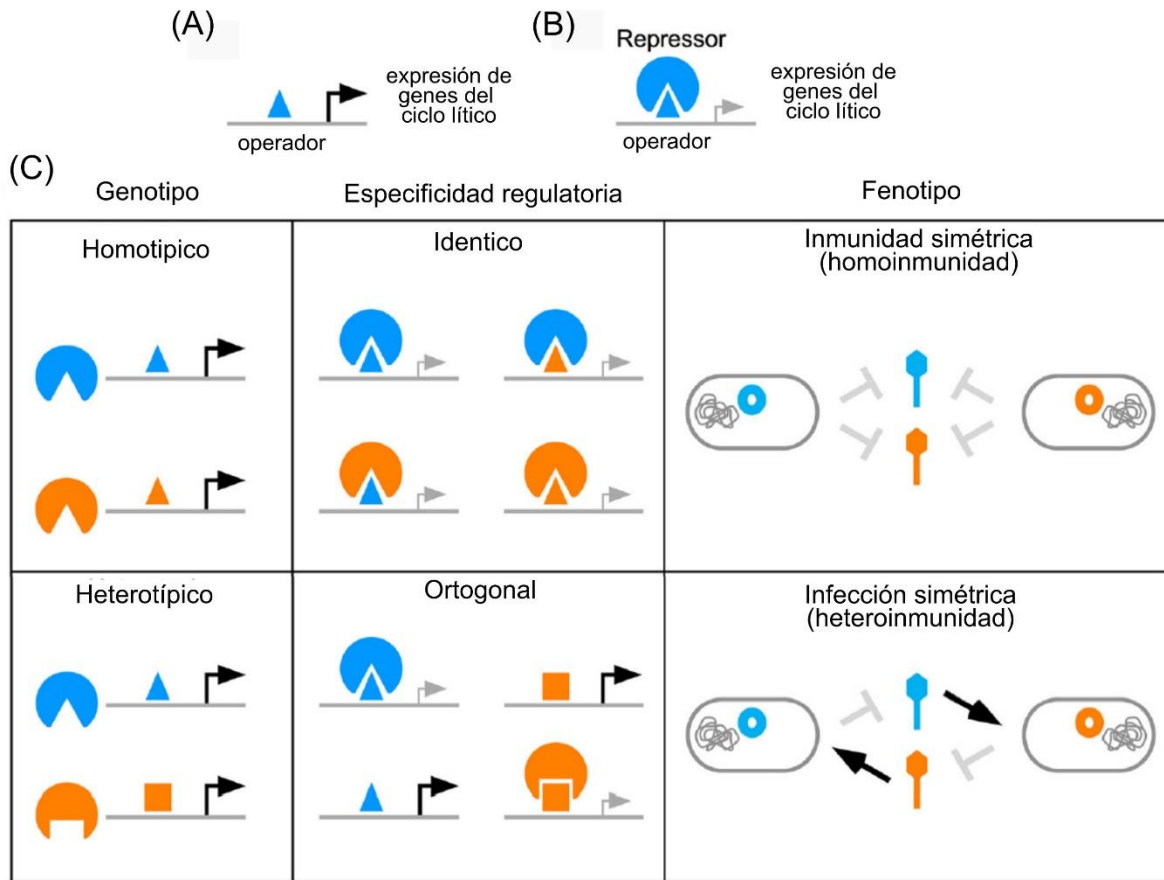


Figura 6. Relación entre sistema de inmunidad a la superinfección, genotipos y fenotipo. A) y B): Los fagos temperados contienen elementos de regulación genética como represores (círculos) y operadores (triángulos) que forman un circuito regulatorio con diferentes especificidades para controlar la expresión de genes del ciclo lítico. C) Durante el proceso de superinfección, el profago residente y el fago superinfectivo pueden contener elementos genéticos homotípicos con especificidades idénticas que pueden resultar en fenotipos de inmunidad simétrica (homoimmunidad). Alternativamente, el profago residente y el fago superinfectivo pueden contener elementos genéticos heterotípicos, es decir, sistemas de inmunidad no relacionados entre sí, mostrando una especificidad ortogonal que no interactúa genéticamente resultando en fenotipos de infección simétrica (heteroimmunidad). Modificado de Mavrigh & Hatfull, 2019.

4 Antecedentes generales

En múltiples estudios se ha demostrado que la sobreexplotación en la producción de exoproteasas por individuos no cooperadores puede provocar un colapso poblacional. Sin embargo, dichos estudios se han enfocado en cepas clínicas de referencia como PAO1 y PA14, las cuales no reflejan necesariamente la diversidad genotípica de la especie, particularmente la de cepas ambientales, que hasta ahora permanecen poco estudiadas (Diggle *et al.*, 2007; Loarca *et al.*, 2019; Sandoz *et al.*, 2007).

Además, se sabe que algunos aislados clínicos (Cruz *et al.*, 2020) y ambientales (Martínez-Carranza *et al.*, 2020) todavía producen factores de virulencia dependientes de QS en ausencia de un LasR funcional. Entre ellos se encuentra la cepa ID4365, un aislado de *P. aeruginosa* del Océano Índico que tiene una mutación sin sentido en el gen *lasR* la cual cambia un codón CAG en el aminoácido 24 por un codón de paro TAG por lo que no puede producir un regulador de LasR funcional. En esta cepa, la producción pirocianina y exoproteasas está controlada por RhIR (Cocotl-Yañez *et al.*, 2020). Por lo tanto, es interesante determinar si los mutantes con un RhIR inactivado se comportarían como oportunistas de exoproteasa que se pueden seleccionar en crecimiento continuo de la caseína como única fuente de carbono.

Por otra parte, se ha observado que tanto las cepas clínicas como ambientales en *P. aeruginosa* son frecuentemente lisógenas, es decir, que acarrean profagos inducibles (González De Aledo *et al.*, 2023; Johnson *et al.*, 2022).

A pesar de esta abundancia de profagos en los genomas de cepas de *P. aeruginosa* falta por explorar más la relación que puede haber entre estos y las dinámicas de producción y explotación de exoproteasas.

Hay algunos estudios sobre la relación de fagos temperados y los sistemas de *quorum sensing* de cepas de referencia de *P. aeruginosa* como el de Saucedo-Mora *et al* (2017), donde reportaron que los fagos temperados JBD30 y D3112 se reproducen más eficientemente en las cepas con un sistema QS funcional que en

uno deficiente de PA14. Sorprendentemente, hay una mayor replicación de los fagos en el fenotipo con sistema QS funcional que en las cepas con fenotipo de QS deficiente (mutantes en *lasR* y *rhIR*). A su vez, hay un menor conteo de células viables en PA14 con un sistema de QS deficiente. Por lo tanto, la supervivencia de las cooperadoras es favorecida sobre las oportunistas.

Esto demuestra que los bacteriófagos son capaces de seleccionar cepas con sistemas de QS con reguladores funcionales y reproducirse mejor en ese fenotipo que en el mutante en las proteínas reguladoras LasR y RhIR, pues en el primero entran en un ciclo predominantemente lisogénico manteniendo así un comportamiento cooperativo en la población al eliminar a los cheaters de quórum.

5 Antecedentes directos

En el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo el cargo del Dr. Rodolfo García Contreras, se observó que la interacción de *P. aeruginosa* con fagos puede limitar el crecimiento poblacional de los cheaters en modelos *in vitro* e *in vivo*, sugiriendo que los fagos son un factor que regula la proliferación de estos dentro de la población (Saucedo-Mora *et al.*, 2017). Sin embargo, en el contexto de crecimiento en cultivos seriados en medio mínimo con caseína 0.25% (peso/volumen (P/V) y colapsos poblacionales de cepas ambientales, el papel de los fagos temperados de *P. aeruginosa* permanecía inexplorado.

Recientemente en el laboratorio se midió el crecimiento a una densidad óptica D.O.) a 600 nanómetros (600 nm) de las cepas ambientales M-10, IGB y ID4365 y la cepa clínica de referencia PA14 de *P. aeruginosa* (UCBPP-PA14) durante cultivos seriados en medio mínimo con caseína 0.25%. Se observó un colapso poblacional (cese del crecimiento) temprano en dos cultivos de la cepa ID4365, uno en el pase 11 y otro en el 18, mientras que el resto de las cepas solo mostraron una tendencia a la baja de su crecimiento, pero no colapsaron durante 23 pases consecutivos, que fue el número de pases continuos en donde se detuvieron los experimentos. El

colapso poblacional de esta cepa resultaba atípico puesto que además de ocurrir en pases más tempranos que el cultivo de PA14 este colapsó a una baja frecuencia de cheaters de exoproteasa. ID4365 presentó individuos cheaters a partir del pase 9 y alcanzando una frecuencia de ~20% en el pase 16. Esto contrastaba con la cepa PA14, que manifestó cheaters a partir del pase 8 y alcanzando hasta ~50% en el pase 20. Por otro lado, las cepas IGB y M10 no presentaron cheaters.

Por otra parte, al aplicar una alícuota de 5 μ L de un sobrenadante obtenido de un precultivo de la cepa ID4365, sobre un tapiz bacteriano de PA Φ (una cepa de *P. aeruginosa* susceptible a la infección por fagos aislada de aguas termales en Oaxaca, México donada por el Dr. Daniel Cázares López del Departamento de Biología de la Universidad de Oxford) se observaron placas líticas. Esto sugirió que la cepa ID4365 es lisógena (Figura 7).



Figura 7. Ensayo de goteo de un sobrenadante obtenido a partir de un precultivo de 16 horas en LB de la cepa ambiental de *P. aeruginosa* ID4365 sobre tapiz bacteriano de la cepa PA Φ .

6 Justificación

Existe poco conocimiento entre las dinámicas de crecimiento en medio mínimo con caseína de cepas lisógenas de *P. aeruginosa* con sistemas de quórum no canónicos, es decir, en donde la proteína LasR no es el regulador maestro del *quorum sensing*. Tampoco hay conocimiento de sus colapsos poblacionales por la acumulación de cheaters de exoproteasas y el papel de sus fagos temperados en dicha dinámica. Por lo tanto, el presente estudio podría ayudar a comprender más sobre las dinámicas de explotación de exoproteasas en cepas lisógenas de *P. aeruginosa*.

7 Hipótesis

Si la inducción de fagos temperados consume recursos metabólicos, entre ellos proteínas del hospedero, y se inducen durante pases continuos en presencia de cheaters de exoproteasas con mutaciones en reguladores de *quorum sensing*, entonces la inducción continua y creciente de profagos podría acelerar la aparición de colapsos poblacionales debido a que representaría un estrés metabólico adicional al oportunismo social.

8 Objetivos

8.1 General

Explorar el papel de la inducción del profago de ID4365 en los colapsos poblacionales de su huésped ante la explotación de exoproteasas debida a cheaters con pérdida de función en reguladores de *quorum sensing*.

8.2 Particulares

1. Determinar las condiciones de cultivo iniciales para la evolución *in vitro* de ID4365 en caseína (medio de precultivo, temperatura, temporalidad de cada pase y actividad caseinolítica).

2. Determinar las proporciones de mutantes *rhIR* de ID4365 en ensayos de competencia con ID4365 silvestre en medio con caseína.
3. Evaluar la frecuencia de colapsos poblacionales, título de profagos inducidos y frecuencia de colonias no productoras de exoproteasa de la cepa ID4365 durante su evolución *in vitro* en caseína 0.25%.
4. Buscar *in silico* secuencias de profagos en el genoma de ID4365.
5. Obtener una cepa lisógena del posible profago de ID4365 en un fondo de una cepa de referencia de *P. aeruginosa* como PAO1 o PA14 y evaluar su frecuencia de colapsos poblacionales, título de bacteriófagos inducidos y frecuencia de colonias no productoras de exoproteasa.
6. Complementar colonias no productoras de exoproteasa aisladas de los experimentos de evolución *in vitro* de ID4365, PAO1 *lasR* y PAO1 *lasR* lisógena de Φ IDHM (PAO1 *lasR* Lis ^{Φ IDHM}) con el plásmido pGMYC (*rhIR*+) y pUCP20 y evaluar su actividad caseinolítica y producción de pirocianina.
7. Secuenciar y buscar mutaciones en el gen *rhIR* en el genoma de dos colonias no productoras de exoproteasa aisladas durante la evolución *in vitro* de la cepa ID4365 en medio mínimo con caseína.

9 Metodología

9.1 Esquema general de trabajo

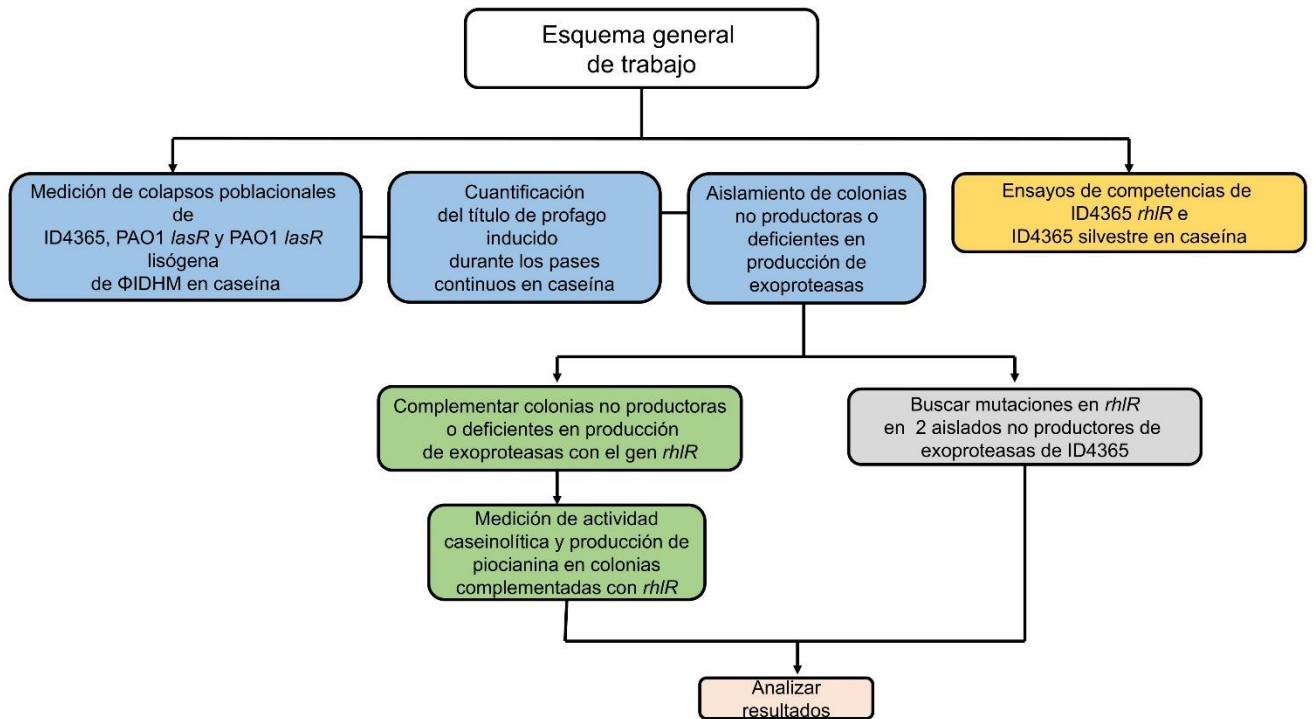


Figura 8. Esquema general de trabajo. Se planeó medir los colapsos poblacionales en las cepas ID4365, PAO1 *lasR* y PAO1 *lasR* Lis^{ΦIDHM} en experimentos de evolución *in vitro* en caseína. Junto con la medición de colapsos poblacionales, se determinó el título de profago inducido durante la evolución *in vitro* en caseína y se aislaron colonias no productoras o deficientes en la producción de exoproteasas. En paralelo, se hicieron ensayos de competencias de ID4365 *rhIR* e ID4365 silvestre en caseína. Posteriormente, de las colonias aisladas no productoras o deficientes en producción de exoproteasas se complementaron con el gen *rhIR* y se midió su actividad caseinolítica y producción de pirocianina. En paralelo, se buscaron mutaciones en gen *rhIR* de dos de estos aislados. Finalmente, se analizaron los datos obtenidos.

9.2 Técnicas y procedimientos

9.2.1 Cepas y condiciones de crecimiento

La cepa ID4365, un aislado ambiental de *P. aeruginosa* con una mutación natural sin sentido en el gen *lasR* (Cocotl-Yañez *et al.*, 2020); la mutante de ID4365 en *rhIR*; PAO1, que fue utilizada como control en algunos ensayos; la mutante de PAO1 en *lasR* (Soto-Aceves *et al.*, 2021) y PAO1 *lasR* Lis^{ΦIDHM} (Huelgas-Méndez *et al.*, 2023). PAΦ, un aislado ambiental de aguas termales en Oaxaca, México que fue donada por el Dr. Daniel Cázares López del Departamento de Biología de la Universidad de Oxford y utilizada como cepa indicadora de ΦIDHM (Huelgas-Méndez *et al.*, 2023). Las clonas deficientes en producción de proteasa de ID4365 PAO1 *lasR* y PAO1 *lasR* Lis^{ΦIDHM} derivadas de los cultivos continuos en caseína fueron transformadas con los plásmidos pUCP20 o pGMYC (Huelgas-Méndez *et al.*, 2023). El plásmido pUCP20 es un vector de clonación replicable en *P. aeruginosa* que se obtuvo al deletar una región del plásmido pUCPIX mediante una restricción con NdeI y StuI, la cual removió regiones de DNA no esencial, y una religación posterior del corte con extremos romos. Por otro lado, el plásmido pGMYC fue construido ligando en pMOS-Blue un fragmento de extremos romos de 1.3 Kb derivado de una restricción en los sitios de corte de *Sma*I y *Kpn*I en pUO58 y luego subclonando al gen *rhIR* en el sitio *Sma*I en pUCP20 (West *et al.*, 1994; Medina *et al.*, 2003). Ambos plásmidos contienen un cassette de resistencia (secuencia de DNA que contiene un gen de resistencia entre uno o más puntos de restricción y se utiliza como marcador de selección de colonias que contienen al plásmido) a carbenicilina por lo que las clonas transformadas fueron seleccionadas con carbenicilina 200 µg/mL. Cada cepa se respaldó en crioviales de 1.5 mL con glicerol al 16.6% (volumen/volumen (V/V)) y almacenadas en un ultracongelador a -70°C.

Las cepas fueron rutinariamente cultivadas en medio LB (triptona 1.6 % (P/V), NaCl 1% (P/V), extracto de levadura 0.5% (P/V)), BHI (infusión cerebro-corazón al 0.6% (P/V), digerido péptico de tejido animal al 0.6% (P/V), digerido pancreático de

gelatina al 1.45 % (P/V), cloruro de sodio al 0.5% (P/V), dextrosa al 0.3% (P/V), fosfato de sodio dibásico al 0.25% (P/V)) a 37°C. Para medir el halo de proteólisis en placa de PAO1 e ID4365 las cepas se cultivaron en medio mínimo M9 (KH₂PO₄ al 1.5% (P/V), NaCl al 0.25% (P/V), Na₂HPO₄ al 3.39% (P/V), NH₄Cl al 0.5% (P/V), MgSO₄ 2mM y CaCl₂ 1 mM) con 0.25% (P/V) de casaminoácidos y 0.25% (P/V) de caseína y agar al 1.1%. Para los ensayos de competencia y evolución *in vitro* se utilizó medio mínimo M9 con caseína al 0.25% (P/V).

9.2.2 Condiciones iniciales para experimentos de evolución *in vitro* en caseína

Para estandarizar las condiciones iniciales para los experimentos de evolución *in vitro* de la cepa ID4365 en medio mínimo M9 con caseína 0.25% (P/V) se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: tiempo de pase inicial, medio de cultivo para precultivos, actividad caseinolítica durante tiempo de pase y temperatura iniciales de cultivo.

Para estandarizar el tiempo en el que se harían los pases consecutivos en caseína 0.25% (P/V), se tomó una colonia de la cepa ID4365 en agar LB y se realizó un estriado en una caja de medio mínimo M9 con casaminoácidos 0.25% (P/V) y caseína 0.25% (P/V), se incubó a 37°C y se tomaron fotos a las 24 horas y 48 horas de crecimiento. En este medio los casaminoácidos son fuente de nitrógeno y carbono necesaria para que las bacterias crezcan sin necesidad de producir exoproteasas, mientras que la adición de la caseína promueve la producción de exoproteasas, además el medio de cultivo es traslúcido por lo que se logra observar de una forma más clara la presencia de halos de proteólisis (Loarca *et al.*, 2019). Se consideró a la cepa PAO1 como control.

Para definir la temperatura inicial, se tomaron en cuenta los datos publicados por (Grosso-Becerra *et al.*, 2014) en donde demuestran que tanto la concentración de N-butil-L-homoserín lactona (C4-HSL) como de la proteína RhIR de ID4365 es mayor a 37°C que a 30°C. Después, para determinar el medio de cultivo líquido óptimo para los precultivos de los experimentos de pases continuos en caseína se procedió a realizar una curva de crecimiento en caseína 0.25% (P/V) durante 48

horas a 37°C, partiendo de precultivos de ~16 horas en medio LB y BHI. La densidad óptica a 600 nm se midió a partir de lavados con solución salina 0.9% (P/V) de una alícuota del cultivo. En paralelo, se realizó la medición de la actividad caseinolítica de los cultivos. La cepa PAO1 fue utilizada como control en ambos experimentos.

9.2.3 Evolución *in vitro*

Se sembraron precultivos a 37°C por 16 horas en medio BHI a partir de una colonia crecida en agar LB. Posteriormente se realizó un pase a una D.O. a 600 nm inicial de 0.05 en 5 mL de medio mínimo con caseína 0.25% (P/V). Cada 48 horas se midió la D.O. a 600 nm del cultivo lavado con solución salina 0.9% para descartar la absorbancia dada por compuestos en el cultivo que interfieren con aquella que correspondía con la densidad celular. Para esto último se hicieron lavados tomando una alícuota de 100 µL del cultivo que se centrifugó por 2.5 minutos a 13,000 revoluciones por minuto (rpm), se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 100 µL de solución salina estéril; se centrifugó una segunda vez a 2.5 minutos a 13,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 100 µL de solución salina estéril. Se midió la DO a 600nm del cultivo lavado y se hicieron pases a una D.O. inicial de 0.05. Esto se repitió hasta que la D.O. a 600 nm del cultivo lavado fuera ≤ 0.05 .

9.2.4 Ensayos de competencia

Los ensayos de competencia se llevaron a cabo inoculando cultivos en medio M9 con caseína al 0.25% (P/V) de la cepa ID4365 silvestre (productora de exoproteasa) con la mutante de ID4365 en *rhIR* con proporciones iniciales de 95% (D.O. 600 nm inicial de 0.04) y 5% (D.O. 600 nm inicial de 0.01), respectivamente. Las proporciones iniciales de cada cepa fueron calculadas utilizando una longitud de onda de 600nm y a partir de precultivos de ~16 horas y se realizaron por duplicado.

9.2.5 Aislamiento y conservación de bacteriófagos

En los pases iniciales y pares de los experimentos de evolución *in vitro* se tomaron alícuotas de 1 mL del cultivo en microtubos y se centrifugaron por 5 minutos. a

13,000 rpm. Posteriormente, se filtraron con filtros de 0.22 μm y se almacenaron a 4 °C hasta por 6 meses.

9.2.6 Titulación de bacteriófagos por técnica de doble agar

Se prepararon precultivos de la cepa tapiz (PA Φ) en 5 mL de medio LB a partir de 1 colonia en agar LB y se incubó a 37°C con 200 rpm por 16 horas. Se hicieron diluciones seriadas 1:100 en buffer SM (100 mM NaCl; 8 mM MgSO₄ 7H₂O; 50 mM Tris-HCl a pH 8) del filtrado con bacteriófagos a titular. Posteriormente se tomaron alícuotas de 4 mL de top agar 0.7% (P/V) (triptona al 1% (P/V), NaCl al 0.5% (P/V), Bacto agar al 0.7% (P/V) y MgSO₄ 10 mM) y se mezclaron con 150 μL de cultivo overnight de PA Φ , se vertió sobre una caja de agar T Φ (triptona 1% (P/V), 0.5% (P/V) NaCl, 1.1% (P/V) Bacto agar) y se dejó solidificar. Luego, se colocaron 5 μL de cada dilución sobre el tapiz bacteriano y se dejó secar en esterilidad por 15 minutos y se incubó a 37°C por 16 horas. Al final se contaron el número de placas líticas, tomando en cuenta un rango de 3 a 30 como placas contables y finalmente se calculó el título en unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL) usando la fórmula (1):

$$(1) \text{ PFU/mL} = \# \text{ placas líticas} / \text{dilución} * \text{volumen goteado (mL)}$$

$$\text{Ejemplo: } 5 \text{ placas} / 0.001 * 0.005 \text{ mL} = 1 \times 10^6 \text{ PFU/mL}$$

9.2.7 Purificación de placas líticas y preparación de stock intermedio de bacteriófagos

Las placas líticas de ΦIDHM formadas sobre los tapices de PA Φ fueron picadas con palillos estériles y estriadas sobre el diámetro de una placa con medio T Φ (triptona al 1% (P/V), NaCl al 0.5% (P/V), Bacto agar al 1.1% (P/V)). Subsecuentemente, un tapiz PA Φ fue colocado en dicha placa y se incubó a 37°C por 24 h. Este paso de purificación fue repetido tres veces de manera secuencial para asegurar la pureza de las placas lítica seleccionadas en cada paso. A partir del último pase de purificación se seleccionaron alrededor de 20 placas líticas aisladas y con la ayuda de una punta amarilla para micropipeta fueron transferidas a un microtubo

conteniendo 1 ml de buffer SM. Dicho tubo se mantuvo en agitación (200 rpm) por ~3 h a 37°C para la recuperación del fago y fue centrifugado posteriormente a 13 rpm por 5 minutos para precipitar el resto celular. Se aplicó cloroformo a 1/10 del volumen y finalmente, el sobrenadante fue transferido a un nuevo microtubo y el stock formado fue almacenado a 4°C en oscuridad.

9.2.8 Preparación de ministock de bacteriófagos

Se realizó un ensayo de infección en placa completa utilizando 100 uL de las diluciones -4, -3, -2 y -1 de un stock puro de Φ IDHM con una concentración de aprox. 1×10^7 a 1×10^9 PFU/mL y se mezcló con 150 uL de un precultivo de 16 horas de PA Φ en 4 mL de top agar 0.7%. El tiempo de adsorción fue de 10 minutos. Se aplicó un vórtex e inmediatamente se vertió la mezcla sobre una caja de agar T Φ para generar tapiz bacteriano infectado. Se dejó que el top agar solidificara y se incubó a 37°C, por 16 horas. Se seleccionó la caja en donde se observaron placas líticas confluentes (aprox. 1×10^6 PFU de Φ IDHM produjeron placas confluentes en PA Φ). Luego, se agregaron 4 mL de buffer SM en cada placa y se dejó 16 horas con las placas selladas con parafilm y a 4°C. Al día siguiente, se levantó el top agar con ayuda de una espátula metálica y se recolectó en tubos Corning de 50 mL con ayuda de una micropipeta de 5 mL. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante cuidadosamente procurando no tomar parte del pellet con la ayuda de una pipeta de 5 mL y se repitió la centrifugación. Finalmente, se filtró el sobrenadante con un filtro de 0.22 μ m usando una jeringa de 10 mL en un tubo Corning de 15 mL estéril.

9.2.9 Determinación de actividad caseinolítica

En cada pase inicial y par se estrió una alícuota del cultivo en caseína 0.25% (P/V) sobre una caja de agar LB y se incubó a 37°C por 16 horas. Posteriormente, se transfirieron 25 colonias en cajas de agar LB suplementadas con leche descremada y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Luego, se cultivaron 10 colonias en 2 mL de LB a 37°C, 200 rpm seleccionando de cada caja aquellas colonias que presentaran un halo de proteólisis y aquellas que no en una proporción 1:1. Luego, se midió la D.O. a 600 nm de cada cultivo y se centrifugaron 400 μ L por 2 minutos

a 13,000 rpm. Después, en placas de 96 pozos se hizo una dilución 1:10 del sobrenadante en azocaseína (10 μ L de sobrenadante en 90 μ L de azocaseína). A un tubo extra se le agregó 10 μ L de agua como control en 90 μ L de azocaseína. La azocaseína es utilizada para medir la actividad proteolítica de una colonia bacteriana y consiste en caseína conjugada con una tinción azo. Al degradarse la azocaseína por la presencia de exoproteasas en el sobrenadante la tinción se libera y solubiliza. La absorbancia de dicha tinción se puede cuantificar a 403 nm después de precipitar el sustrato no degradado (Filloux & Ramos, 2014). Se procedió entonces a incubar las muestras a 37°C durante 1 h. 45 minutos. Posteriormente, se añadió 50 μ L de muestra y a tubos de 1.5mL con 200 μ L de ácido nítrico al 1% y se centrifugó por 2 minutos a 13,000 rpm. La azocaseína no degradada, es insoluble en ácido nítrico y al centrifugarla la separa de la tinción azo, la cual es soluble (Filloux & Ramos, 2014). Se añadió 150 μ L de NaOH al 0.5% (P/V) en placas de 96 pozos y se mezcló con 50 μ L del sobrenadante del paso anterior. Finalmente, se midieron los pozos en un lector de microplacas a una longitud de onda de 403 nanómetros (403 nm).

9.2.10 Determinación de producción de piocianina

Se tomó 500 μ L de un precultivo de aprox. 16 horas y se centrifugó durante 2 minutos a 13,000 rpm. Se tomaron 400 μ L de sobrenadante y se añadieron 210 μ L de cloroformo. Se agitó vigorosamente la muestra durante un minuto a velocidad máxima y se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm. Se tomaron 150 μ L de la fase de cloroformo en el fondo del microtubo y se transfirieron a otro microtubo y se añadieron 800 μ L de 0.1 N HCl. Se agitó vigorosamente por 1 minutos a velocidad máxima y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos. Se tomaron 300 μ L de la fase acuosa superior y se transfirieron a pozos de una microplaca para medir las absorbancias a una longitud de onda de 520 nanómetros (520nm).

9.2.11 Generación de cepas lisógenas

Se partió de un cultivo de aprox. 16 horas a partir de una colonia crecida en agar LB con 100 μ g de Gentamicina de la cepa PAO1 Δ *lasR*; se tomaron 150 μ L y se mezcló con 10 μ L en un tubo de 15 mL de una dilución 10^{-6} de un stock puro de

Φ IDHM con un título de $\sim 1 \times 10^9$ PFU/mL. Se dejó adsorber el fago a su huésped durante 10 minutos y se adicionó 4 mL de top agar. Se agitó vigorosamente por 3 segundos y se plaqueó sobre una caja de agar LB. Se dejó secar y se incubó a 30°C, por 16 horas. Al día siguiente, se observaron placas líticas aisladas sobre el tapiz de PAO1 $\Delta lasR$; se picó sutilmente con un palillo estéril la zona turbia de la placa lítica en donde hubo crecimiento bacteriano, y por lo tanto posibles lisógenas, y se estrió en una caja de agar LB y se incubó a 37°C, por 16 horas. Luego, se seleccionaron 21 colonias candidatas a lisógenas y se hicieron 3 pases de purificación en cajas de agar LB de cada una. Se hizo un precultivo de aprox. 16 horas de cada una de las candidatas junto con la cepa parental (PAO1 $\Delta lasR$) y se hicieron crecimientos iniciales en una placa de 48 pozos a una D.O. inicial de 0.05 con 1 mL de LB. Al llegar los cultivos a fase exponencial (D.O. ~ 0.5) se adicionaron 3.0 μ g/mL de Mitomicina C el cual es un agente intercalante del DNA que induce a los profagos a su ciclo lítico al activar el sistema SOS del huésped. Se continuó el crecimiento durante 6 horas más. Posteriormente, se centrifugó cada cultivo por 10 min. a 13,000 rpm y se agregó 100 μ L de cloroformo y se guardaron los sobrenadantes a 4°C. Posteriormente, se gotearon 5 μ L de las diluciones logarítmicas (1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} , 1×10^{-8}) de los sobrenadantes sobre un tapiz de la cepa parental utilizando al sobrenadante de la cepa PAO1 $\Delta lasR$ parental como control. Si se observaron placas líticas con la morfología del fago Φ IDHM entonces la prueba de la inducción del fago con Mitomicina C fue positiva. Para corroborar este ensayo se procedió a hacer una prueba de homoinmunidad colocando tapices de las candidatas que fueron positivas a la prueba de inducción y goteando sobre ellas diluciones logarítmicas de un stock puro de Φ IDHM y como control sobre un tapiz de la cepa PAO1 $\Delta lasR$. Si no hubo lisis sobre los tapices de las candidatas después de incubar los goteos a 37°C, por 16 horas la prueba era positiva. Si ambas pruebas fueron positivas, la de inducción con mitomicina C y la de homoinmunidad, se consideró a dicha cepa como una lisógena del fago Φ IDHM ($Lis^{\Phi IDHM}$). Una PCR para el gen *csrA* fue hecha para comprobar molecularmente la lisogenia de Φ IDHM en las cepas.

9.2.12 Extracción de DNA genómico, PCR y complementación

La extracción del DNA genómico de la cepa ID4365, la mutante de PAO1 *lasR* y PAO1 *lasR* Lis^{ΦIDHM} fue hecha utilizando el kit Quick-DNA™ Miniprep Plus y siguiendo el protocolo del fabricante. La PCR fue hecha para amplificar el gen *csrA* presente en el genoma del fago temperado ΦIDHM. Los oligonucleótidos empleados para amplificar el gen *csrA* fueron: forward, 5'-GTGACCGTCGTCGAGAACAGA-3'; reverse, 5'-GCCTGACCTTCTAGCCAGATC-3', y las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 95 °C, 1 minuto luego 29 ciclos: 95°C, 1 minuto; 60°C 30 segundos; 72°C, 30 segundos; paso de extensión final, 72°C, 5 minutos.

Las colonias deficientes en producción de proteasa derivadas de las cepas ID4365, mutante de PAO1 *lasR* y PAO1 *lasR* Lis^{ΦIDHM}, fueron transformadas con los plásmidos pGMYC (pUCP20-*rhIR*) o con el vector vacío pUCP20 usando electroporación y seleccionando a las colonias transformadas con cajas de LB con carbenicilina 200 µg/mL. Posteriormente se cultivaron 24 horas a 37°C, 200 rpm en 5 mL de medio LB para medir la producción de pocianina o en BHI para medir la producción de exoproteasas.

9.2.13 Secuenciación genómica

Se partió de un precultivo de alrededor de 16 horas en LB de dos clones de ID4365 deficientes en producción de exoproteasa para extraer su DNA genómico. La síntesis de la biblioteca se realizó utilizando el Kit de preparación de muestra de ADN Nextera XT (Illumina, San Diego CA, EE. UU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los adaptadores TruSeq HT (Illumina, San Diego CA, EE. UU) se usaron para codificar las bibliotecas y cada biblioteca se secuenció utilizando un instrumento Illumina MiSeq de extremos pareados de 300 pb. Se utilizó BBduk v.38.18 (Bushnell *et al.*, 2017) para procesar los archivos fastq de las lecturas crudas para remover los adaptadores y la remoción de regiones de baja calidad en las lecturas con los siguientes parámetros: ftl=17 ftr=300 y ftl=18 ftr=294 para ID14 e ID16, respectivamente. El parámetro “ftl” define cuántas bases desde la izquierda a partir de la base cero se quieren remover y “ftr” después de qué base hacia la derecha se quiere remover en la lectura de secuenciación. Por ejemplo, para una

secuencia con un tamaño de 350 pb. ftl=17 removerá las bases del 0 a la 16 (manteniendo la base 17) y ftr=300 removerá las bases posteriores a la base 300. Al final quedará una lectura con 284 pb.

9.2.14 Análisis bioinformático

El genoma del profago de ID4365, Φ IDHM, fue identificado usando el genoma de ID4365 como datos de entrada en el servidor web de PHASTER (<https://phaster.ca/>). El mapa circular de los alineamientos genómicos de los fagos Φ IDHM, LKA5, H66 y F116 fue hecho utilizando el servidor web de GView (<https://server.gview.ca/>). La búsqueda de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en las cepas deficientes en producción de exoproteasa derivadas de los experimentos de evolución *in vitro* en caseína de ID4365, ID14 e ID16 fue hecha comparándolas con las del genoma de ID4365 parental (Grosso-Becerra *et al.*, 2014). El análisis fue hecho usando nucmer y parsnp (Marçais *et al.*, 2018; Treangen *et al.*, 2014).

9.2.15 Microscopía electrónica

Se depositaron 10 μ l de una suspensión de fagos de aproximadamente 10^{10} PFU/mL en una rejilla de cobre recubierta de colodión y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. La solución sobrante se absorbió con papel de filtro y la rejilla se tiñó una vez con acetato de uranilo al 2% (pH 7) durante 1 minuto. Las rejillas se examinaron bajo un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1010 a 80 Kv. Las dimensiones de los viriones se calcularon a partir del promedio de 10 partículas virales.

9.2.16 Análisis estadísticos

Todas las pruebas estadísticas fueron hechas utilizando el software R versión 4.3.1. La prueba Shapiro-Wilks fue utilizada para saber si los datos presentaban una distribución Gaussiana. La comparación entre grupos fue evaluada con pruebas paramétricas (t de Student) y no paramétricas (U de Mann-Whitney), según el caso. La comparación entre proporciones de variables categóricas fue evaluada usando la prueba de chi-cuadrada. Para todas las pruebas estadísticas, el valor de significancia fue de $p < 0.05$.

10 Resultados

10.1 Condiciones iniciales para experimentos de evolución *in vitro* en caseína

Para estandarizar el tiempo en el que se harían los pases continuos en caseína se procedió a crecer a la cepa ID4365 y PAO1 tal como se describe en la metodología. En la cepa ID4365 se observó un halo de proteólisis casi imperceptible a las 24 horas de crecimiento haciéndose evidente a las 48 horas mientras que en la cepa PAO1 se presentó un halo de proteólisis perceptible desde las 24 horas aumentando su tamaño a las 48 horas. (Figura 9). Esto indicaba una producción de exoproteasas retardada en ID4365 probablemente debido a su mutación en *lasR* en comparación con la cepa PAO1 que presentó un halo de proteólisis desde las 24 horas. Esto último concordaba con lo reportado por Dekimpe & Déziel, 2009 en donde demostraron la expresión retardada de elastasa en mutantes en *lasR* de PAO1 y PA14, las cuales comenzaban a producir elastasa en la fase estacionaria tardía del crecimiento en comparación con las cepas silvestres y además lo hacían bajo el control del sistema Rhl. En consecuencia, el tiempo de cada pase continuo en caseína se determinó que sería cada 48 horas.

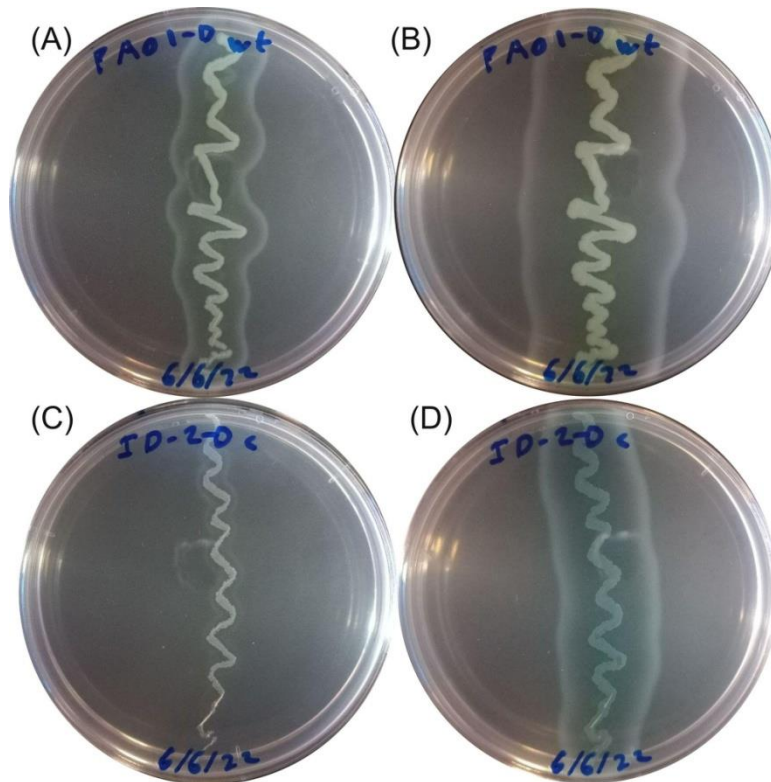


Figura 9. Estriados de las cepas PAO1 e ID4365 en cajas de agar caseína con casaminoácidos (cas/cas). (A) Crecimiento de PAO1 silvestre a las 24 horas, (B) Crecimiento de PAO1 silvestre a las 48 horas (C) Crecimiento de ID4365 a las 24 horas. (D) Crecimiento de ID4365 a las 48 horas.

Para definir la temperatura inicial, se tomaron en cuenta los datos publicados por (Grosso-Becerra *et al.*, 2014) en donde demuestran que tanto la concentración de N-butil-L-homoserín lactona (C₄-HSL) como de la proteína RhlR de ID4365 es mayor a 37°C que a 30°C. Esto mismo se observó en nuestros experimentos (Figura 10) en donde se registraron las densidades ópticas (600 nm) de los cultivos en medio mínimo con caseína 0.25% de 3 réplicas biológicas de ID4365 que partieron de un precultivo en BHI. Hubo un crecimiento ligeramente mayor a 37°C que a 30°C a las 48 horas (Figura 10). La densidad óptica más elevada a las 24 horas en 37°C en comparación con 30°C pudo deberse a la acumulación de productos de desecho y células lisadas, por lo que se decidió medir las densidades ópticas de los cultivos en caseína a partir de dos lavados con solución salina 0.9% para eliminar esas variables. Por lo tanto, la temperatura óptima para los experimentos de evolución *in vitro* fue de 37°C.

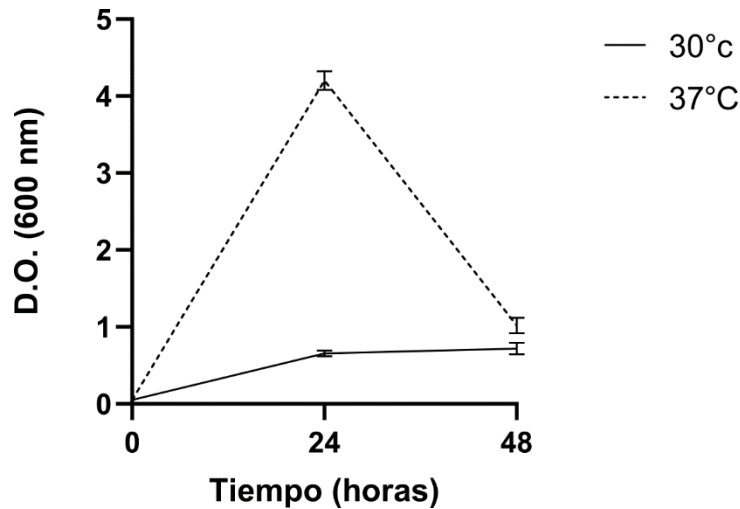


Figura 10. Crecimiento de ID4365 en medio mínimo con caseína 0.25% a 30°C y 37°C durante 48 horas. Las mediciones son el promedio de 3 réplicas biológicas.

Para determinar el medio de cultivo líquido óptimo para los precultivos de los experimentos de pases continuos en caseína se siguieron los pasos descritos en la metodología. Se observó que el crecimiento de ID4365 es bajo en caseína a comparación de PAO1 tanto en precultivo de LB como BHI durante las primeras 36 horas y es a las 48 horas que es cuando hay una mayor densidad óptica en la cepa ID4365 que inicia en BHI contra la que inicia en LB (Figura 11A). Al comparar las actividades caseinolíticas después de las 36 h de crecimiento en caseína se presentó un aumento de la actividad caseinolítica en las colonias de ID4365 que comienzan con medio BHI en precultivo a diferencia de las que inician con LB (Figura 11B).

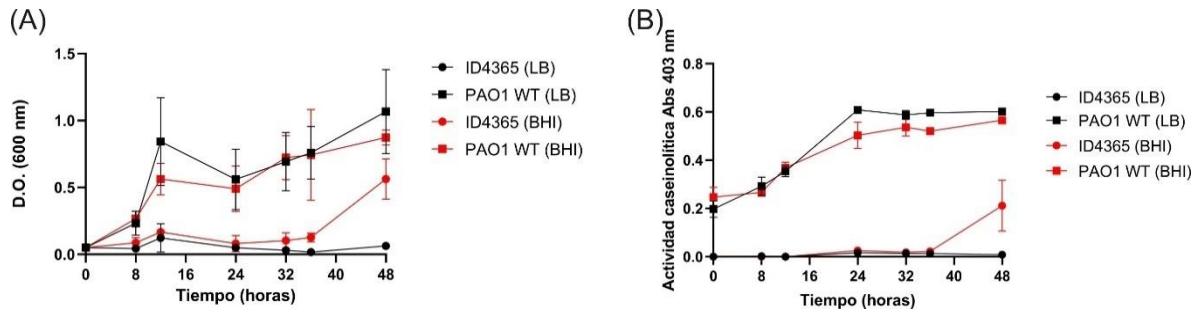


Figura 11. Crecimiento celular y actividad caseinolítica de ID4365 y PAO1 en LB y BHI, respectivamente. (A) curva de crecimiento en caseína de las cepas ID4365 y PAO1 silvestre a partir de precultivos de ~16 horas en LB y BHI, respectivamente. (B) curva de actividad caseinolítica (Abs 403 nm) de ID4365 y PAO1 silvestres a partir de precultivos de ~16 horas en LB y BHI, respectivamente. Todas las mediciones son promedios de 3 réplicas biológicas.

Este resultado concuerda con lo visto en las cajas de agar y medio mínimo M9 con casaminoácidos 0.25% y caseína 0.25% en donde la aparición de un halo de proteólisis fue mayor a 48 horas que a 24h en ID4365. Sin embargo, la razón por la cual se presentó una mayor actividad caseinolítica a partir de un precultivo en BHI que en LB aún no está clara. Una hipótesis podría ser que la cantidad de proteínas y peptonas en BHI es mayor que en LB, además de que el medio BHI está adicionado con dextrosa. Todo esto promueve mayor crecimiento de la población, lo que podría concordar con una mayor cantidad de concentración de autoinductores que al hacer el pase hacia el medio mínimo con caseína podrían ir en una mayor concentración junto con los componentes del medio BHI que a partir del medio LB y promover así una mayor expresión de exoproteasas. Esto no solamente fue observado en la cepa ID4365, sino también en PAO1 mutante *lasR* (Figura 12).

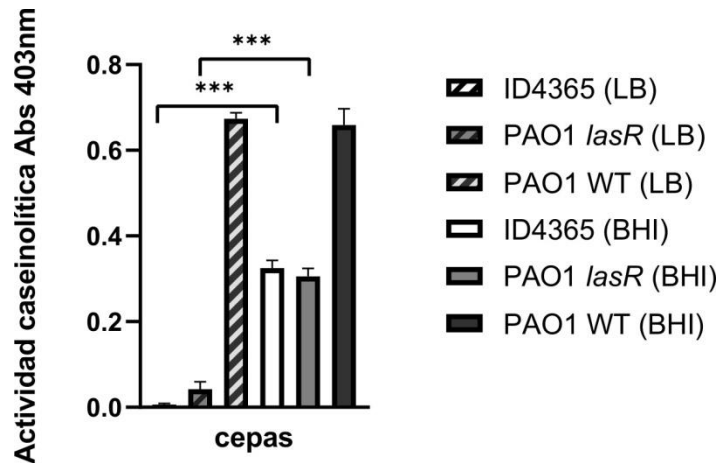


Figura 12. Actividad caseinolítica de las cepas ID4365, PAO1 *lasR* y PAO1 silvestre en LB y BHI. La medición fue hecha a partir de sobrenadantes de cultivos de ~16 horas de cada cepa por triplicado biológico. ANOVA-de una vía ($p < 0.05$). *** = $p < 0.0001$

Con base en estos resultados, se decidió que el medio de cultivo líquido para realizar los pases consecutivos en caseína 0.25% sería BHI.

10.2 Ensayos de competencia

Dado que los cheaters de exoproteasa evolucionan en PAO1 y PA14 como mutantes en *lasR* (Sandoz *et al.*, 2007; Loarca *et al.*, 2019) y en ID4365 el sistema principal de *quórum sensing* es el sistema Rhl (Cocotl-Yañez *et al.*, 2020), se utilizó a una mutante de ID4365 en *rhIR* para comprobar si esta podría explotar a la cepa silvestre en co-cultivo. Primero se comprobó que dicha mutante no tuviera un crecimiento en caseína al igual que ID4365 y PAO1 silvestre, pero fuera capaz de crecer en presencia de un medio mínimo con casaminoácidos (Figura 13A y 13B).

Para investigar si la mutante en *rhIR* de ID4365 se comportaba como un oportunista social se hicieron ensayos de competencia entre esa mutante y la cepa silvestre en medio mínimo con caseína 0.25%. La proporción inicial de la población mutante incrementó de $6 \pm 2.8\%$ (tiempo 0) a $30 \pm 2.8\%$ y $36 \pm 5.6\%$ después de 24 horas y 48 horas, respectivamente (Figura 13C). Por lo tanto, estos resultados confirman nuestra hipótesis de que una mutante en *rhIR* puede actuar como un oportunista social ante un genotipo mutante en *lasR*.

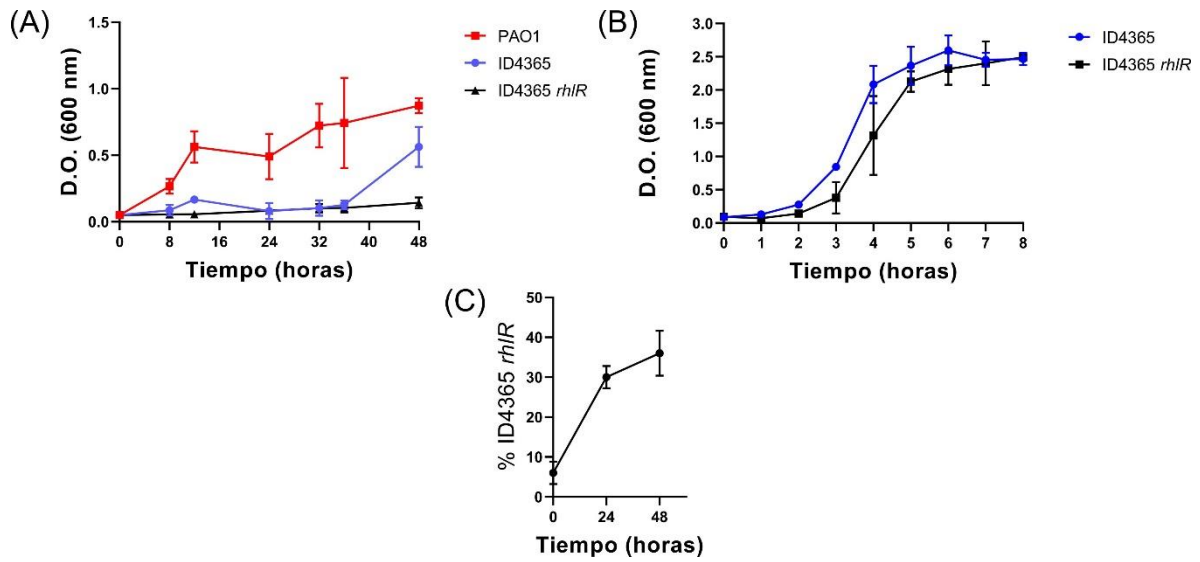


Figura 13. Cinéticas de crecimiento de PAO1, ID4365 silvestre e ID4365 *rhIR* en caseína, casaminoácidos y ensayos de competencia de ID4365 e ID4365 *rhIR*. (A) Curva de crecimiento en caseína de PAO1, ID4365 e ID4365 mutante *rhIR*. (B) Curva de crecimiento en casaminoácidos de ID4365 e ID4365 mutante *rhIR*. (C) Proporción de ID4365 mutante *rhIR* en competencia con ID4365 silvestre en caseína 0.25%.

10.3 Identificación y aislamiento del profago de ID4365

Usando la secuencia genómica de ID4365 (RefSeq: NZ_ATAI000000000) como datos de entrada en el servidor web de PHASTER se encontró la secuencia genómica de un fago intacto ubicado en el contig 20 del genoma de ID4365 (RefSeq: ATAI01000086). La anotación detallada mediante el servidor web de PATRIC confirmó la presencia de 67 secuencias codificantes que comprenden módulos de replicación, estructurales, lisis, así como dos genes asociados a que el probable profago es potencialmente inducible (terminasa y represor) (Johnson *et al.*, 2022) (Figura 14).

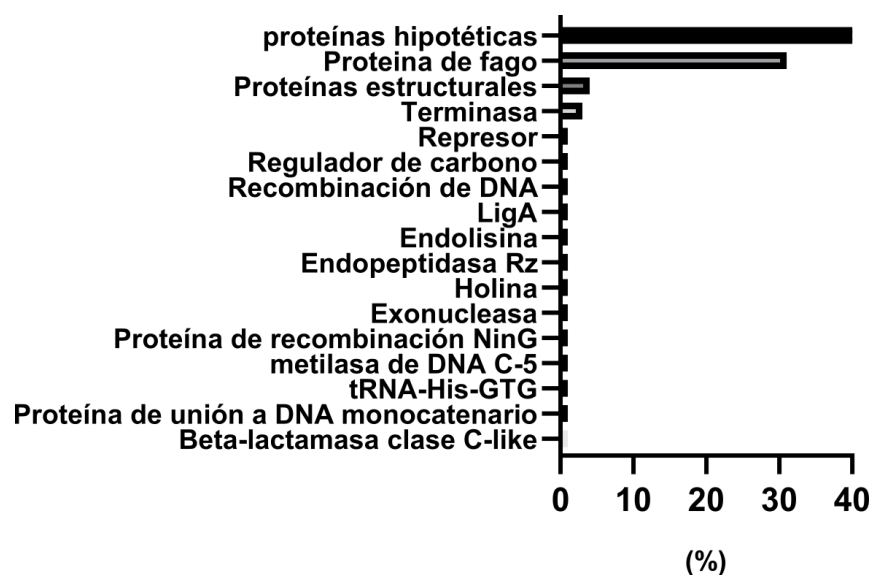


Figura 14. Anotación funcional realizada por PATRIC del genoma del profago de ID4365 predicho por PHASTER.

Para comprobar que el profago era inducible dentro de nuestras condiciones iniciales de cultivo (37°C, agitación orbital a 200 rpm, precultivo en BHI, pases en caseína cada 48 horas) colocamos 5 µL de los filtrados de sobrenadantes obtenidos de un cultivo de 48 horas de crecimiento en caseína de ID4365 sobre tapices bacterianos de PA14, PAO1 y PAΦ. Se observaron placas líticas sobre los tapices de PAO1 y PAΦ, corroborando de esta forma la inducción activa de este profago en la cepa ID4365 (Figura 15 A-D).

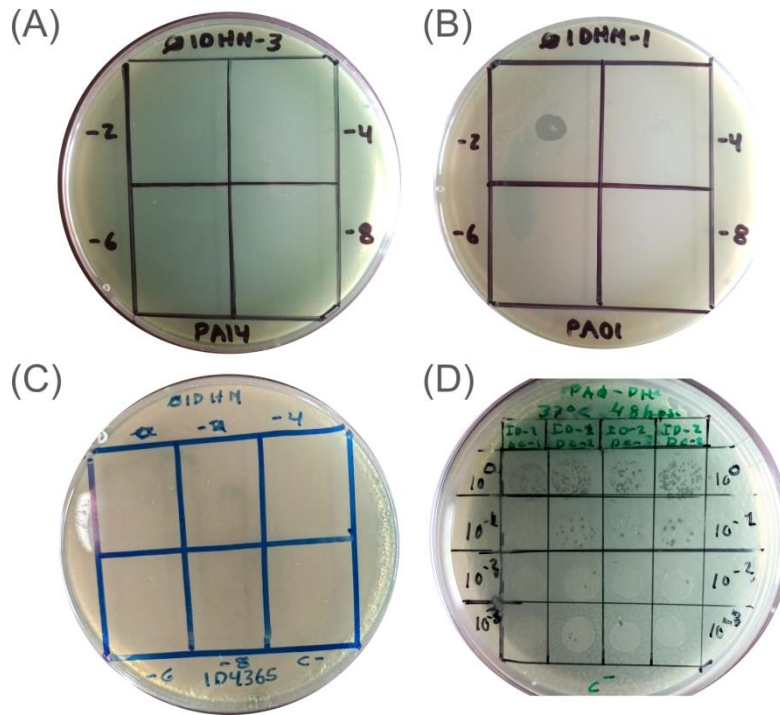


Figura 15. Ensayos de goteo de sobrenadantes de cultivo de 48 horas de ID4365 en caseína sobre tapices de cepas de referencia y una indicadora de infección por bacteriófagos de *P. aeruginosa*. (A) goteo de diluciones del sobrenadante de ID4365 crecida en caseína 48 horas sobre tapiz bacteriano de PA14. (B) Goteo de diluciones del sobrenadante de ID4365 crecida en caseína 48 horas sobre tapiz bacteriano de PAO1. (C) Goteo de diluciones del sobrenadante de ID4365 crecida en caseína 48 horas sobre tapiz bacteriano de ID4365. (D) Goteo de diluciones del sobrenadante de ID4365 crecida en caseína 48 horas sobre tapiz bacteriano de PAΦ.

Se seleccionó a la cepa PAΦ como cepa indicadora para este fago y la morfología de placa de este se mantuvo durante los experimentos de evolución *in vitro* en caseína de ID4365 (Figura 16A). El profago aislado fue purificado y visualizado por microscopía electrónica para su caracterización morfológica siguiendo los criterios de Ackermann, 2007. La morfología de este fago mostró una cabeza icosaédrica con 50 ± 10 nm de largo anclada a una cola corta típica de los bacteriófagos pertenecientes a la familia *Podoviridae* (Figura 16B). Este profago, el cual se nombró como ΦIDHM tiene un genoma de 58.3 Kb. La comparación genómica hecha con BLAST mostró una relación cercana (>95% de identidad) con otros fagos que poseen genes asociados a un ciclo de vida lisogénico y lítico, es decir temperados, de *P. aeruginosa* como fueron los bacteriófagos H66 (NC_042342.1) y

LKA5 (NC_073675.1) los cuales pertenecen al grupo de bacteriófagos F166-*like* (Figura 16C).

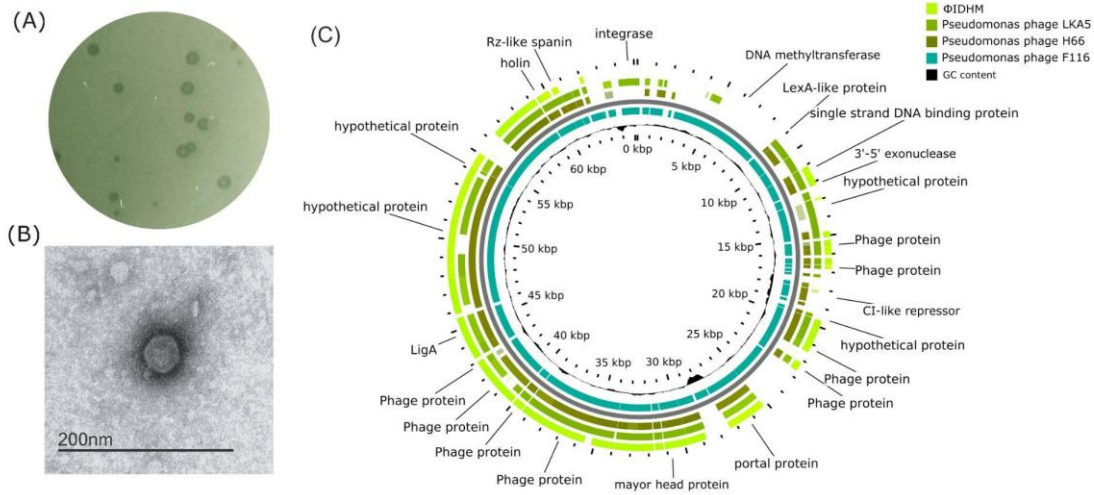


Figura 16. Propiedades fenotípicas y genotípicas del fago temperado ΦIDHM aislado de la cepa ambiental ID4365. A) Morfología de placa de ΦIDHM en un césped bacteriano de PAΦ. B) Micrografía electrónica de un virión de ΦIDHM, que muestra la morfología típica de un podovirus. C) Comparación circular genómica de ΦIDHM con tres de sus homólogos del grupo de fagos similares a F116.

10.4 Evolución experimental de ID4365 en caseína

Para investigar el oportunismo social de exoproteasas en la cepa ID4365 durante pases seriados en medio mínimo con caseína 0.25% se llevó a cabo un precultivo de aproximadamente 16 horas en BHI de colonias aisladas en agar LB y pases a una densidad óptica inicial de 0.05 cada 48 horas con medio fresco en cada pase. Cada pase involucró el lavado de células en una alícuota de 100 μ L de cultivo para remover el exceso de exoproteasas, productos de desecho y otros compuestos que pudieran interferir con la densidad óptica del cultivo a 600 nm. Cuatro cultivos independientes de ID4365 fueron entonces crecidos bajo estas condiciones y como se ha observado en estudios anteriores, el crecimiento de la población fue en decremento a medida que se avanzaba en los pases seriados (Figura 17A).

Como era esperado, los colapsos poblacionales fueron observados, en promedio, en el pase 17 ± 12 , los individuos deficientes en producción de exoproteasa se

acumularon alcanzando en 2 de 4 cultivos niveles de 40% y 90% antes del colapso poblacional en los pases 14 y 6, respectivamente (Figura 17A y 17B). No obstante, aunque los otros dos cultivos acumularon niveles similares de estos individuos durante los pases seriados en caseína, el colapso de uno de ellos se prolongó hasta el pase 34, mientras que el otro colapsó en el pase 15 y ambos presentaron dicho colapso en ausencia de individuos deficientes en producción de exoproteasas (Figuras 17A y 17B). Esto sugirió que hay otros factores además del oportunismo social de exoproteasas que pueden estar asociados a colapsos poblacionales en la cepa ID4365.

Se planteó la hipótesis de que uno de los factores de colapso poblacional podría ser la inducción del fago Φ IDHM durante el crecimiento de ID4365 en caseína. En concordancia con dicha hipótesis, la titulación del fago (normalizada con el crecimiento del cultivo) a partir de la recolección y filtrado de sobrenadantes de los cultivos permitió observar un incremento generalizado de esta variable durante los pases seriados. Esa tendencia en el aumento progresivo de la inducción del profago se observó en todos los cultivos excepto para el que le tomó más tiempo colapsar. Dicho cultivo mostró un nivel bajo de la inducción del profago durante los pases intermedios, pero un incremento de esta inducción durante los pases tardíos. Sin embargo, todos los cultivos mostraron una inducción elevada del fago (Figura 17C). Por ejemplo, la inducción de Φ IDHM en el cultivo de ID4365 que colapsó tempranamente (pase 6) incrementó hasta $\sim 5.4 \times 10^9$ PFU/mL antes de que ocurriera el colapso. Los cultivos que colapsaron en los pases 14 y 15 presentaron un título de fago de $\sim 10^6$ PFU/mL. El cultivo que colapsó en el pase 34 presentó un título de fago similar (10^7 PFU/mL). Por lo tanto, estos resultados sugieren que una alta inducción del profago puede influir en la aparición de colapsos poblacionales de su huésped en altas y bajas proporciones de individuos deficientes en la producción de exoproteasa en una población de *P. aeruginosa* lisógena mutante en *lasR*.

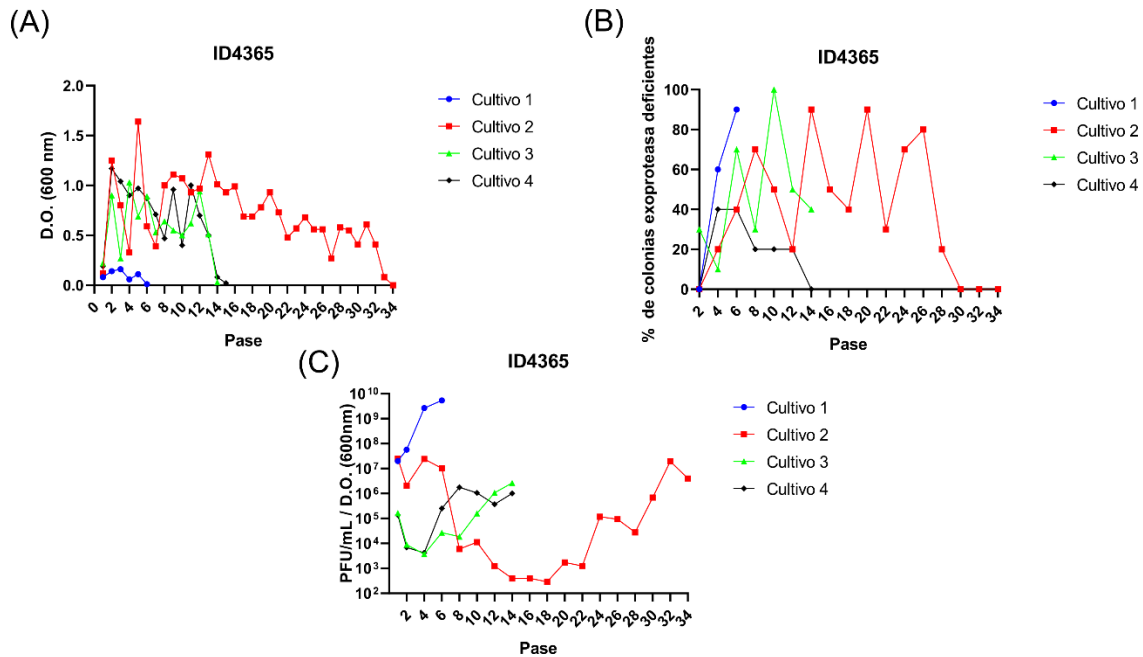


Figura 17. Dinámica de crecimiento de la cepa ID4365, proporción de colonias proteasa deficientes e inducción de profago en medio M9 con caseína al 0.25% como única fuente de carbono. El primer pase se inoculó utilizando precultivos en BHI a partir de una sola colonia de ID4365 en agar LB y los pases de crecimiento posteriores se realizaron cada 48 horas e inoculado con bacterias del paso anterior a una turbidez inicial de 0.05 (D.O. 600 nm). Los resultados de 4 cultivos independientes se muestran en diferentes colores cada uno. A) densidad poblacional de ID4365 estimada por lecturas de D.O. (600 nm) de lavados con solución salina 0.9% durante los pases de crecimiento. B) Porcentaje de colonias deficientes en proteasa obtenidas de cada pase par de crecimiento de los experimentos que se muestran en la Figura 16A. C) Títulos de fago Φ IDHM de cada pase par de crecimiento de los cultivos que se muestran en la Figura 16A, los títulos se normalizaron con el correspondiente crecimiento bacteriano.

Para explorar más si los cheaters de ID4365 podían recuperar su fenotipo de producción de exoproteasa al recibir una copia funcional del gen *rhIR*, se transformaron dos colonias que mostraron una actividad caseinolítica y producción de pocianina baja aisladas del pase 6 del cultivo 1 de ID4365, el cual colapsó tempranamente. Estas colonias fueron designadas como ID14 e ID16 y se transformaron con el vector pGMYC (pUCP20-*rhIR*⁺) junto con 2 colonias deficientes en producción de exoproteasas de PAO1 mutante *lasR* y PAO1 *lasR* Lis ^{Φ IDHM}. Estos ensayos de complementación restauraron la actividad de exoproteasa para todas las colonias y de pocianina en la mayoría de las colonias evaluadas. Por otro lado, la actividad de exoproteasa y pocianina de estas mismas colonias con el vector

vacío (pUCP20) no produjo estos efectos (Figura 18A y 18B). Esto sugería que dichas colonias eran potencialmente mutantes en *rhIR*. Sin embargo, su secuenciación genómica y el escaneo de mutaciones puntuales ocupando el genoma de ID4365 parental como referencia no muestra cambios en el gen *rhIR*, su promotor o el operón *rhIA-rarD* completo, lo que sugiere posibles mutaciones en otros tipos de genes regulatorios que podrían estar también involucrados en la pérdida de la actividad de exoproteasas y producción de pirocianina en estos aislados.

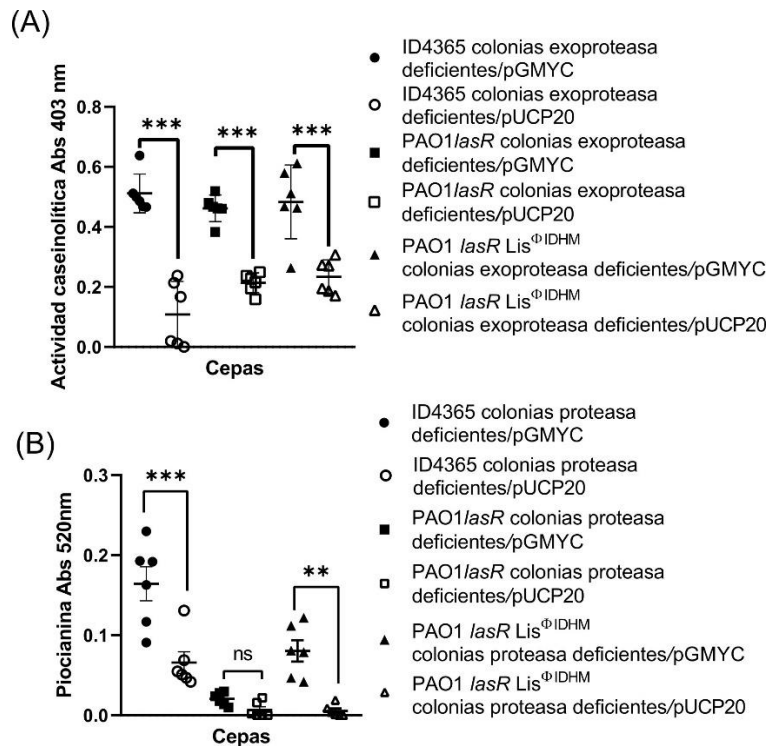


Figura 18. Ensayos de complementación del gen *rhIR* con el vector PGMYC en colonias deficientes en producción de exoproteasa de ID4365 y PAO1 *lasR* aisladas durante pases continuos en caseína A) Actividad caseinolítica y B) Producción de pirocianina de dos colonias deficientes en exoproteasas de ID4365 transformadas con pUCP20 o pGMYC, dos colonias deficientes en exoproteasas de PAO1 *lasR* transformadas con pUCP20 o pGMYC y de dos colonias deficientes en exoproteasas de PAO1 *lasR* Lis^{IDHM} transformadas con pUCP20 o pGMYC. ** = $p < 0.001$; *** = $p < 0.0001$; ns = $p > 0.05$.

Las secuencias genómicas de ID14 e ID16 están en la base de datos de GeneBank del NCBI con los identificadores JAULSS000000000 y JAULST000000000, respectivamente.

Además, se buscó en el genoma de ID14 e ID16 si había mutaciones puntuales con respecto al genoma de ID4365 silvestre y se encontraron algunas mutaciones no sinónimas (Tabla 2). Estas mutaciones se relacionaron principalmente con componentes de los sistemas de secreción tipo V y tipo VI tanto en ID14 como en ID16. Es probable que la consecuencia de las mutaciones en el sistema de secreción tipo V en ID14 e ID16 en particular en la proteína TpsB2 esté relacionada con una disminución en la secreción de exoproteasas como LepA (TpsA4) de ID4365 (RefSeq: NZ_ATAI01000152; posición: 7,956 a 10,676) (Tabla 1 y 2). Por otro lado, llama la atención las mutaciones en los genes relacionados al SSTVI pues no se conocen exoproteasas en *P. aeruginosa* que sean secretadas a través de este sistema, pero cabría la posibilidad de que ID4365 posea al menos una exoproteasa que sea secretada a través del SSTVI.

Otras mutaciones puntuales en genes relacionados con la detección de óxido nítrico y el regulador transcripcional del mantenimiento de la lisogenia e inducción de profagos Cro/C1 se presentaron en ID14. Esto último es interesante pues, aunque se desconoce la consecuencia estructural de dicha mutación, probablemente haya llevado a una mayor inducción del profago en ID14.

Tabla 2. Mutaciones únicas no sinónimas presentes en las colonias ID14 e ID16

Nombre de la colonia secuenciada	Gen mutado y función del gen	Cambio de nucleótido	Cambio del aminoácido	Numero de acceso en RefSeq	Referencia
ID14	<i>tpsB2</i> , transportador TpsB2 del Sistema de secreción tipo V	C → G	L364V	JAUSS000000000	(Huelgas-Méndez <i>et al.</i> , 2023)
	<i>M002_RS30990</i> , Proteína detectora de óxido	T → G	V65G		

	nítrico, NosP				
	<i>tssI</i> , proteína de la punta del sistema de secreción tipo VI TssI/VgrG	C → T	E496K		
	<i>M002_0426</i> <i>0</i> , Regulador transcripcio nal de la familia Cro/CI	T → G	S204R		
	171 nucleótidos río arriba del gen <i>M002_RS06</i> <i>485</i> , proteína del sistema de inyección contráctil de la familia VgrG/Pvc8	G → A	N/A		
ID16	<i>tpsB2</i> , transportado r TpsB2 del sistema de secreción tipo V	A → C	N387H	JAU1ST0000 00000	(Huelgas- Méndez <i>et al.</i> , 2023)
	142 nucleótidos río arriba de la proteína del sistema de inyección contráctil de la familia	A → G	N/A		

	VgrG/Pvc8				
--	-----------	--	--	--	--

10.5 Papel del fago Φ IDHM en el crecimiento y colapsos poblacionales de PAO1 *lasR*

El potencial papel del fago temperado Φ IDHM en desencadenar colapsos poblacionales en su huésped fue evaluado en un fondo de PAO1 mutante *lasR* ya que esta cepa está filogenéticamente emparentada con ID4365 y posee la misma mutación en el gen *lasR* (Grosso-Becerra *et al.*, 2014; Martínez-Carranza *et al.*, 2020). PAO1 *lasR* Lis ^{Φ IDHM} fue generada a partir de un stock puro del fago Φ IDHM. Se seleccionó una lisógena candidata que salió positiva para la prueba de homoinmunidad en donde se gotearon diluciones de un stock puro de fago Φ IDHM sobre un tapiz bacteriano de dicha candidata (Figura 19B). La presencia de Φ IDHM como profago en el genoma de PAO1 *lasR* fue confirmada en la cepa lisógena por una PCR para amplificar el gen *csrA* presente solamente en el genoma de Φ IDHM. Como se esperaba, el gen *csrA* fue amplificado en el DNA genómico de ID4365 y de PAO1 *lasR* Lis ^{Φ IDHM}, pero no en el genoma de PAO1 *lasR* (Figura 19A).

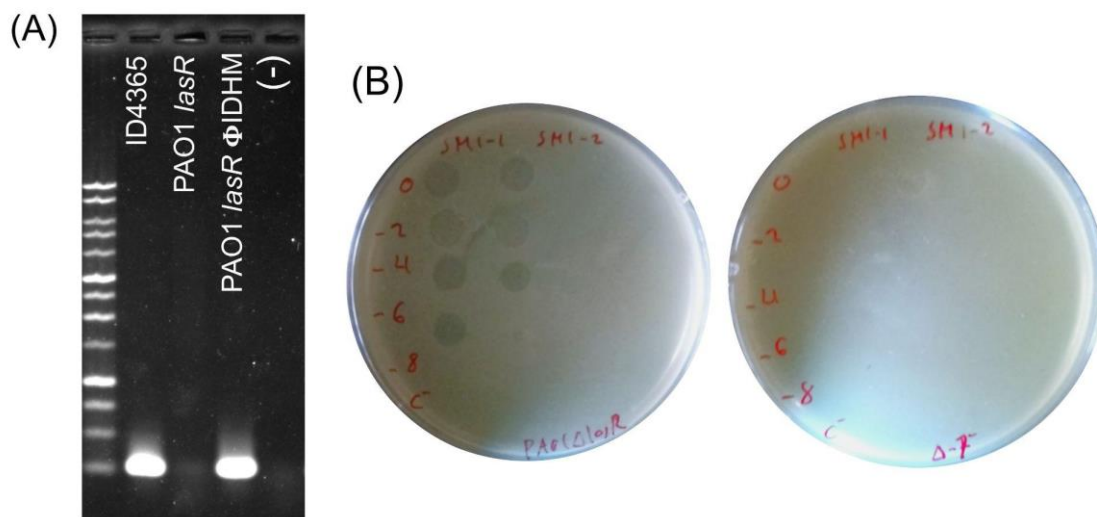


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la amplificación del gen *csrA* por PCR y ensayos de homoinmunidad de una lisógena de PAO1 $\Delta lasR$ de $\Phi IDHM$. A) PCR para la amplificación del gen *csrA* solo presente en el genoma del fago $\Phi IDHM$, la banda esperada de 234 pb se amplificó utilizando los genomas de las cepas ID4365 y PAO1 *lasR* Lis $\Phi IDHM$, pero no se amplificó utilizando el genoma de PAO1/*lasR*. B) Efecto del fago $\Phi IDHM$ en tapices de PAO1 *lasR* (izquierda) y PAO1 *lasR* Lis $\Phi IDHM$ (derecha).

La cepa PAO1 *lasR* Lis $\Phi IDHM$ y su versión isogénica fue crecida en las mismas condiciones que la cepa ID4365 para evaluar su frecuencia de colapsos poblacionales, proporción de individuos deficientes en producción de exoproteasa e inducción de profago. Interesantemente, PAO1 *lasR* Lis $\Phi IDHM$ colapsó prematuramente en el pase 24 ± 2 comparada con su versión no lisógena, la cual colapsó en el pase 33 ± 9 (Figura 20A y 20B) ($p < 0.05$, prueba t-Student). También se encontró que la inducción de $\Phi IDHM$ en PAO1 *lasR* Lis $\Phi IDHM$ alcanzó títulos de entre 10^5 a 10^6 PFU/mL antes de colapsar (Figura 20C). Además, el porcentaje de individuos deficientes en la producción de exoproteasas incrementó durante los pases seriados en ambas cepas alcanzando una acumulación promedio de colonias deficientes en producción de exoproteasa en PAO1 *lasR* de 63 ± 35 y de 47 ± 27 en PAO1 *lasR* Lis $\Phi IDHM$ antes del colapso poblacional, respectivamente (Figuras 20D y 20E) ($p < 0.05$, t-Student). Además, el rasgo de colonias deficientes en producción de exoproteasas estuvo asociado a la cepa PAO1 *lasR* ($p < 0.05$, prueba de chi-cuadrada), lo que puede indicar que la inducción activa del fago $\Phi IDHM$ en la población de PAO1 *lasR* Lis $\Phi IDHM$, pudo estar ejerciendo una lisis tanto en individuos

productores como deficientes en la producción de exoproteasas y por ello se observó menor proporción de individuos con este rasgo en la población de la cepa lisógena acelerando así, en promedio, su colapso poblacional.

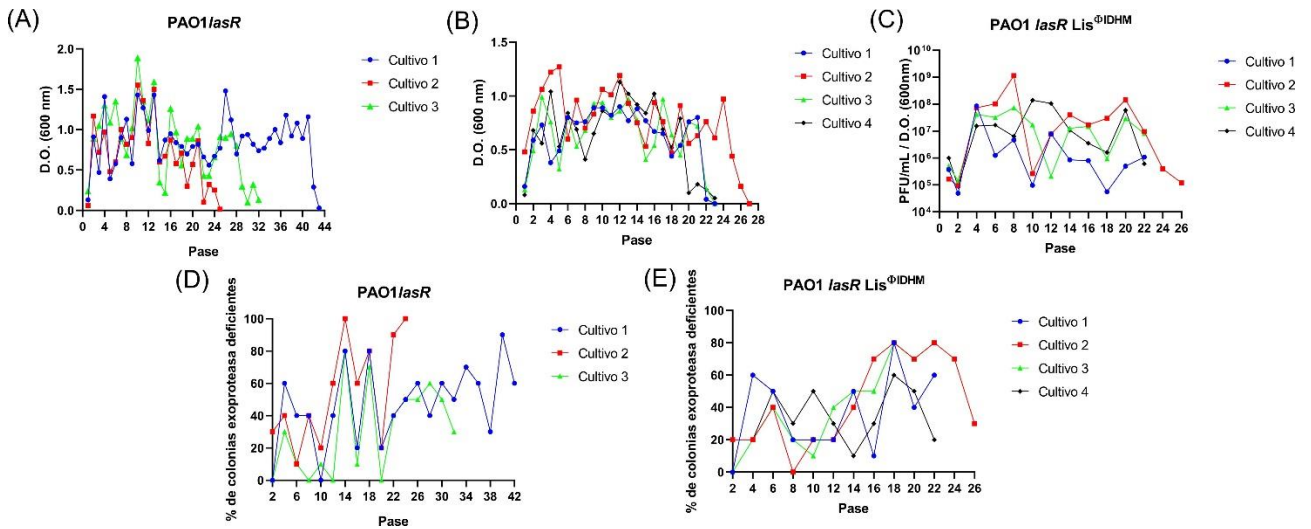


Figura 20. Dinámicas de crecimiento de PAO1 *lasR* PAO1, PAO1 *lasR* Lis Φ IDHM, título de profago inducido en PAO1 *lasR* Lis Φ IDHM y proporción de colonias deficientes en producción de exoproteasa de PAO1 *lasR* y PAO1 *lasR* Lis Φ IDHM durante los pases seriados en caseína. A) y B) Crecimiento continuo de PAO1 *lasR* y PAO1 *lasR* Lis Φ IDHM en medio M9 con 0.25% de caseína como única fuente de carbono. Resultados de cultivos independientes se muestran en diferentes colores cada uno. C) Títulos de fago Φ IDHM de pases pares de crecimiento de los cultivos que se muestran en la Figura 19A para la cepa PAO1 *lasR* Lis Φ IDHM, los títulos se normalizaron con el correspondiente crecimiento bacteriano (D.O. 600 nm). D) y E) Porcentaje de colonias proteasa deficientes obtenidas de pases pares de crecimiento de los experimentos que se muestran en la Figura 19A y 19B, respectivamente.

Al igual que se hizo con las colonias deficientes en exoproteasa de ID4365, se seleccionaron dos colonias con estas características derivadas de PAO1 *lasR* y dos de PAO1 *lasR* lisógena de Φ IDHM para complementarlas con una versión funcional del gen *rlhR*⁺, las cuales restauraron su capacidad de producir exoproteasa. En el caso de la producción de piocianina, para el caso de las colonias de PAO1 *lasR* no hubo un cambio significativo en los individuos transformados con el vector pGMYC contra los transformados con pUCP20, mientras que en PAO1 lisógena sí hubo un cambio significativo entre estos dos grupos (Figura 18A y 18B) ($p < 0.05$, t-Student).

En general, el fago Φ IDHM aceleró el tiempo de colapso población en un fondo genético comparable con el de la cepa ID4365 lo que sugiere que los profagos inducibles son elementos genéticos móviles con un papel activo en la dinámica de explotación de exoproteasas en las poblaciones bacterianas.

Promediando los tiempos de colapso, la proporción de colonias deficientes en producción de exoproteasa y el título de profago inducido de la cepa ID4365 y un fondo genético comparable que fue la cepa PAO1 *lasR* Lis Φ IDHM, se muestra, que, en promedio, la proporción de individuos deficientes en su producción de exoproteasa presentaron niveles considerables y con poca variación en su proporción. Mientras tanto, el título de profago inducido fue incrementándose hasta alcanzar un título alto antes del colapso de las poblaciones de ID4365 y PAO1 *lasR* Lis Φ IDHM. Esto sugiere que tanto el oportunismo social de exoproteasas como la inducción del fago son eventos que coexisten durante la evolución de la población, sin embargo, la inducción creciente del profago parece ser una variable que influye para que el colapso poblacional se acelere. Por lo tanto, los profagos inducibles son elementos genéticos móviles con un papel activo en la dinámica de explotación de exoproteasas en las poblaciones bacterianas (Figura 21, Figura 1).

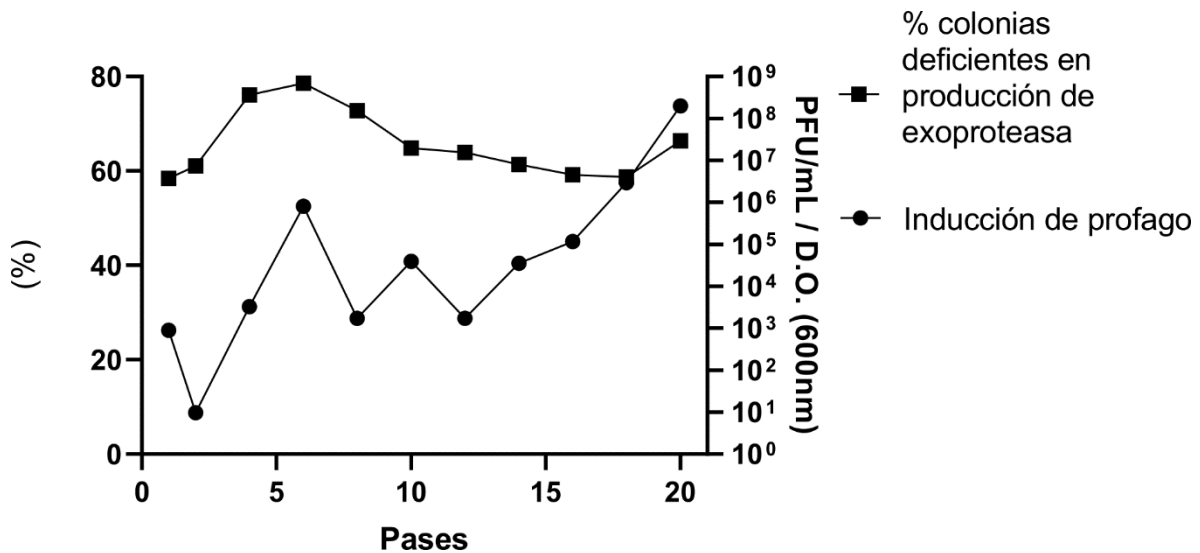


Figura 21. Valores promedio de porcentaje de colonias deficientes en producción de exoproteasa y de inducción del profago Φ IDHM de los cultivos de ID4365 y PAO1 *lasR* Lis Φ IDHM. El número de pases promedio fue el promedio de los pases de colapso poblacional en caseína tanto de ID4365 como de PAO1 *lasR* Lis Φ IDHM.

11 Discusión

El fenómeno del oportunismo social en cepas de *P. aeruginosa* fue estudiado por primera vez en cepas de referencia como PAO1 (Sandoz *et al.*, 2007). Sin embargo, puede haber diferencias en la producción de bienes públicos y regulación de sistemas de *quorum sensing* entre las cepas ambientales y las clínicas. Algunas de esas diferencias consisten en la pérdida del regulador de *quorum sensing* LasR, así como la capacidad de producir exoproteasas, rasgos que han sido encontrados entre diferentes aislados ambientales de *P. aeruginosa* (Groleau *et al.*, 2022). Ambos rasgos se encuentran en la cepa ID4365 y E80, las cuales pueden producir exoproteasas en presencia de caseína reguladas por RhlR y no LasR (Chen *et al.*, 2019; Huelgas-Méndez *et al.*, 2023). Interesantemente, en condiciones como la escasez de nutrientes prolongada, se llegan a seleccionar variantes de PAO1 con interrupciones en *lasR* las cuales restauran su producción de elastasa al incrementar los niveles de producción de *rhlI* (Van Delden & Iglewski, 1998), mecanismo que desconocemos si lleva a cabo la cepa ID4365, pero que podría estar ocurriendo. Para nuestro conocimiento este es el primer trabajo en donde se estudia el oportunismo social de exoproteasas en un aislado ambiental de *P. aeruginosa* que posee una mutación natural en el gen *lasR*.

Fue interesante observar que en ensayos de competencia en caseína entre una mutante *rhlR* de ID4365 contra la cepa parental, la primera incrementara su proporción, indicando su potencial para que esas variantes pudieran explotar la producción de exoproteasas de ID4365 silvestre. No obstante, de las 2 colonias secuenciadas que se aislaron del pase 7 del primer cultivo de ID4365 en caseína, ID14 e ID16, ninguna presentó alguna mutación en *rhlR*. Como se ha visto con la cepa clínica de *P. aeruginosa* E80, las variantes en *rhlR* al parecer no son muy frecuentes durante experimentos de evolución *in vitro* y más bien emergen variantes oportunistas *pqsR* (Chen *et al.*, 2019). En nuestro trabajo, en la evolución de ID4365 en caseína, las colonias deficientes en la producción de exoproteasas ID14 e ID16 no presentaron mutaciones en genes relacionados con reguladores del *quorum sensing*. Debe haber otros sistemas en los que presente alguna alteración como

sistemas de transporte de proteínas o sistemas anti activadores del *quorum sensing* como QteE, presente en el genoma de ID4365. El antiactivador QteE puede desestabilizar a RhIR al formar un heterodímero con este y por consecuencia disminuir los niveles de transcripción de los genes que regula como *lasB*. (Smith & Schuster, 2022). Por ello, una sobreexpresión de esta proteína podría llevar a un fenotipo cheater de exoproteasa (Asfahl & Schuster, 2018). También es probable que mutantes en *rhIR* y/o *pqsR* emergieran durante la evolución en caseína (Figura 13C), pero posiblemente fueron eliminadas de la población a través de un mayor efecto lítico de Φ IDHM en ese genotipo.

Esta última posibilidad concuerda con el trabajo de (Saucedo-Mora *et al.*, 2017), en donde demostraron que al agregar a los fagos temperados JBD30 y D3112 en un cultivo de PA14 con un fenotipo funcional de QS en caseína en co-cultivo con su versión isogénica con un sistema de QS deficiente (*lasR*/*rhIR*), respectivamente la proporción de mutantes con sistema de QS deficiente disminuía. Por lo tanto, los fagos temperados actuaron como un factor limitante del oportunismo social tanto en caseína como en un modelo de infección *in vivo* de *Galleria mellonella*. Sin embargo, falta por investigar los niveles de inducción del profago en variantes *rhIR* y las clonas ID14 e ID16 contra la cepa parental para verificar si el profago Φ IDHM podría estar limitando la aparición de mutantes en reguladores de *quorum sensing* de la cepa ID4365.

Algunos enfoques alternativos para investigar la función del profago de ID4365 en la dinámica de colapsos poblacionales y oportunismo social de exoproteasas son el curar a esta cepa de su profago e interrumpir o deletar genes esenciales para la producción del profago y su lisogenia. Sin embargo, la primera opción presentaba la dificultad de que las técnicas en el laboratorio para deletar una región de 58.3 Kb del genoma de ID4365 no estaban disponibles. En la opción de deletar genes esenciales para la el mantenimiento de la lisogenia de Φ IDHM como represores el problema era que aún cabía la posibilidad de que el profago pudiera presentar pseudolisogenia, es decir, la capacidad para seguirse replicando como un episoma y así seguir causando un gasto metabólico en su huésped a pesar de interrumpir su

integración al genoma. En el caso de los genes asociados a la inducción, como terminasas, aún se podrían transcribir otros genes del fago asociados a su inducción como excisionasas. También, dado el desconocimiento de la influencia de genes de Φ IDHM sobre la regulación de la producción de genes de exoproteasas u otros genes que influyeran en la dinámica de colapsos poblacionales de su huésped decidimos que el enfoque más sencillo y adecuado fue el que se siguió, es decir, obtener una lisógena de Φ IDHM en una cepa de referencia de *P. aeruginosa* (PAO1) disponible en el laboratorio con una mutación en *lasR*, al igual que en la cepa ID4365 la cual fue PAO1 *lasR* Lis $^{\Phi$ IDHM.

Una manera en la que el fago Φ IDHM podría estar acelerando los colapsos poblacionales en sus huéspedes es que a través de su replicación puede causar una carga metabólica tal que la producción y/o exportación de exoproteasas puede estar disminuyendo. Esto último, debido a que el fago podría estar secuestrando los recursos de su hospedero, particularmente sus aminoácidos para la síntesis de proteínas, en proporción a su inducción, la cual es creciente durante los pases continuos en caseína.

Otra forma en la que los profagos pueden influenciar las dinámicas producción de bienes públicos en sus huéspedes puede ser a través de su control del *quorum sensing*. Por ejemplo, el profago de la cepa AUS531, AUS531phi (Genebank: MN585195), contiene en su genoma el gen *bci* cuyo promotor contiene una caja *rhl-las* putativa, es decir, una secuencia promotora en donde podría unirse el regulador LasR o RhIR. Ambroa *et al.*, 2020, encontraron que el gen *bci* de AUS531phi puede controlar la respuesta de *quorum sensing* en la cepa AUS531 para que el fago lleve a cabo una infección exitosa. Además, este fago puede influir en la cuantificación de factores de virulencia regulados por QS de su huésped AUS531 reduciendo su motilidad y aumentando la formación de biopelícula y producción de pirocianina. Queda por investigar la influencia de este gen en la producción de exoproteasas de su huésped. De hecho, entre el gen *bci* de AUS532phi, y *csrA* en Φ IDHM tienen una identidad del 69% y además está presente en los fagos H66, LKA5 y F116. Esto podría indicar que este gen presente en los fagos de la familia F116-like, como

ΦIDHM, H66 y LKA5, probablemente pueda tener la misma función de reducir la cantidad de algunos factores de virulencia controlados por QS como se observó con el gen *bci* del fago AUS532phi en AUS531.

Un ejemplo de bacteriófagos que poseen sistemas de percepción de densidad poblacional son los profagos de *Bacillus subtilis* del grupo SPβ como phi3T. Estos profagos pueden detectar su densidad poblacional a través de la secreción al medio extracelular de un péptido de 6 aminoácidos. En función de la concentración del péptido en el medio, el profago puede activar su programa lítico o mantenerse en estado de lisogenia. Este sistema es denominado *arbitrium* y se han encontrado homólogos en otras especies del género *Bacillus* (Erez *et al.*, 2017). Además, se ha demostrado que las exoproteasas de *Bacillus subtilis* son un bien público susceptible de ser explotado por variantes no productoras (Rosazza *et al.*, 2023), por lo que el fenómeno de colapsos poblacionales por explotación de exoproteasas y el papel de profagos con sistemas de comunicación *arbitrium* en sus huéspedes está aún por explorarse.

Si a través de genes como *bci* los profagos pueden influenciar la manera en que se expresan factores de virulencia como la piocianina (Ambroa *et al.*, 2020), también podrían influenciar la expresión de sideróforos como la pioverdina, que es considerado, al igual que las exoproteasas, un bien público susceptible de explotación por individuos no productores.

Todo lo anterior alienta la investigación de los posibles papeles que tienen los profagos en la sociobiología de sus huéspedes y demuestra que el estudio de cepas que no son de referencia enriquece nuestro conocimiento de la fisiología y ecología bacteriana.

12 Conclusión

- La inducción de profagos puede acelerar el colapso poblacional en cepas lisógenas de *P. aeruginosa* LasR negativas (LasR⁻) como ID4365 y PAO1 mutante *lasR*.

13 Perspectivas

- Buscar sistemáticamente en otras cepas de *P. aeruginosa* ambientales y clínicas la relación entre la inducción de profagos y colapsos poblacionales en su evolución en caseína como única fuente de carbono.
- Buscar las exoproteasas a través de zimogramas que produce la cepa ID4365 silvestre y los aislados ID14 e ID16 para observar si hay alguna diferencia en sus zimografías y posiblemente encontrar alguna exoproteasa que sea secretada por el SSTVI.

14 Referencias

Ackermann, H.-W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2), 227-243. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0849-1>.

Ambroa, A., Blasco, L., López-Causapé, C., Trastoy, R., Fernandez-García, L., Bleriot, I., Ponce-Alonso, M., Pacios, O., López, M., Cantón, R., Kidd, T. J., Bou, G., Oliver, A., & Tomás, M. (2020). Temperate Bacteriophages (Prophages) in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Belonging to the International Cystic Fibrosis Clone (CC274). *Frontiers in Microbiology*, 11, 556706. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.556706>.

Asfahl, K. L., & Schuster, M. (2018). Additive Effects of Quorum Sensing Anti-Activators on *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Traits and Transcriptome. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2654. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02654>.

Badescu, B., Buda, V., Romanescu, M., Lombrea, A., Danciu, C., Dalleur, O., Dohou, A. M., Dumitrascu, V., Cretu, O., Licker, M., & Muntean, D. (2022). Current State of Knowledge Regarding WHO Critical Priority Pathogens: Mechanisms of Resistance and Proposed Solutions through Candidates Such as Essential Oils. *Plants*, 11(14), 1789. <https://doi.org/10.3390/plants11141789>.

Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G. P. F., Filloux, A., & Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(8), 534-543. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.005>.

Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E. R., Buckling, A., Guttman, D. S., Davidson, A. R., & Maxwell, K. L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME Journal*, 10(12), 2854-2866. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.79>

- Bushnell, B., Rood, J., & Singer, E. (2017). BBMerge – Accurate paired shotgun read merging via overlap. *PLOS ONE*, 12(10), e0185056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185056>.
- Campbell, A. (2003). The future of bacteriophage biology. *Nature Reviews Genetics*, 4(6), 471-477. <https://doi.org/10.1038/nrg1089>.
- Castañeda-Tamez, P., Ramírez-Peris, J., Pérez-Velázquez, J., Kuttler, C., Jalalimanesh, A., Saucedo-Mora, M. Á., Jiménez-Cortés, J. G., Maeda, T., González, Y., Tomás, M., Wood, T. K., & García-Contreras, R. (2018). Pyocyanin Restricts Social Cheating in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1348. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01348>.
- Chen, R., Déziel, E., Groleau, M.-C., Schaefer, A. L., & Greenberg, E. P. (2019). Social cheating in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing variant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(14), 7021-7026. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819801116>.
- Cocotl-Yañez, M., Soto-Aceves, M. P., González-Valdez, A., Servín-González, L., & Soberón-Chávez, G. (2020). Virulence factors regulation by the quorum-sensing and Rsm systems in the marine strain *Pseudomonas aeruginosa* ID4365, a natural mutant in *lasR*. *FEMS Microbiology Letters*, 367(12), fnaa092. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa092>.
- Coêlho, D. F., Saturnino, T. P., Fernandes, F. F., Mazzola, P. G., Silveira, E., & Tambourgi, E. B. (2016). Azocasein Substrate for Determination of Proteolytic Activity: Reexamining a Traditional Method Using Bromelain Samples. *BioMed Research International*, 2016, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2016/8409183>.
- Correa, A. M. S., Howard-Varona, C., Coy, S. R., Buchan, A., Sullivan, M. B., & Weitz, J. S. (2021). Revisiting the rules of life for viruses of microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*, 19(8), 501-513. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00530-x>.
- Cruz, R. L., Asfahl, K. L., Van Den Bossche, S., Coenye, T., Crabbé, A., & Dandekar, A. A. (2020). RhIR-Regulated Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing in a Cystic Fibrosis Isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, 11(2), e00532-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00532-20>.
- Dekimpe, V., & Déziel, E. (2009). Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: The transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiology*, 155(3), 712-723. <https://doi.org/10.1099/mic.0.022764-0>.
- Diggle, S. P., Griffin, A. S., Campbell, G. S., & West, S. A. (2007). Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature*, 450(7168), Article 7168. <https://doi.org/10.1038/nature06279>.

- Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., Melamed, S., Leavitt, A., Savidor, A., Albeck, S., Amitai, G., & Sorek, R. (2017). Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature*, *541*(7638), 488-493. <https://doi.org/10.1038/nature21049>.
- Filloux, A., & Ramos, J.-L. (Eds.). (2014). *Pseudomonas Methods and Protocols* (Vol. 1149). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0>
- Filloux, A. (2011). Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Frontiers in Microbiology*, *2*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00155>.
- Gambello, M. J., & Iglewski, B. H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *Journal of Bacteriology*, *173*(9), 3000-3009. <https://doi.org/10.1128/jb.173.9.3000-3009.1991>.
- Gambello, M. J., Kaye, S., & Iglewski, B. H. (1993). LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infection and Immunity*, *61*(4), 1180-1184. <https://doi.org/10.1128/iai.61.4.1180-1184.1993>.
- García-Contreras, R., Loarca, D., Pérez-González, C., Jiménez-Cortés, J. G., Gonzalez-Valdez, A., & Soberón-Chávez, G. (2020). Rhamnolipids stabilize quorum sensing mediated cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, *367*(10), fnaa080. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa080>.
- García-Cruz, J. C., Huelgas-Méndez, D., Jiménez-Zúñiga, J. S., Rebollar-Juárez, X., Hernández-Garnica, M., Fernández-Presas, A. M., ... & García-Contreras, R. (2023). Myriad applications of bacteriophages beyond phage therapy. *PeerJ*, *11*, e15272.
- García-Reyes, S., Soberón-Chávez, G., & Cocotl-Yanez, M. (2020). The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *Journal of Medical Microbiology*, *69*(1), 25-34. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001116>.
- González De Aledo, M., Blasco, L., Lopez, M., Ortiz-Cartagena, C., Bleriot, I., Pacios, O., Hernández-García, M., Cantón, R., & Tomas, M. (2023). Prophage identification and molecular analysis in the genomes of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from critical care patients. *MSphere*, e00128-23. <https://doi.org/10.1128/msphere.00128-23>.
- Groleau, M.-C., Taillefer, H., Vincent, A. T., Constant, P., & Déziel, E. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* isolates defective in function of the LasR quorum sensing regulator are frequent in diverse environmental niches. *Environmental Microbiology*, *24*(3), 1062-1075. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15745>.

Grosso-Becerra, M. V., Croda-García, G., Merino, E., Servín-González, L., Mojica-Espinosa, R., & Soberón-Chávez, G. (2014). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by two novel RNA thermometers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(43), 15562-15567. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402536111>.

Howard-Varona, C., Hargreaves, K. R., Abedon, S. T., & Sullivan, M. B. (2017). Lysogeny in nature: Mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *The ISME Journal*, 11(7), 1511-1520. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.16>.

Huelgas-Méndez, D., Cazares, D., Alcaraz, L. D., Ceapă, C. D., Cocotl-Yañez, M., Shotaro, T., Maeda, T., Fernández-Presas, A. M., Tostado-Islas, O., González-Vadillo, A. L., Limones-Martínez, A., Hernandez-Cuevas, C. E., González-García, K., Jiménez-García, L. F., Martínez, R.-L., Santos-López, C. S., Husain, F. M., Khan, A., Arshad, M., ... García-Contreras, R. (2023). Exoprotease exploitation and social cheating in a *Pseudomonas aeruginosa* environmental lysogenic strain with a non-canonical quorum sensing system. *FEMS Microbiology Ecology*, 99(9), fiad086. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiad086>.

Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>.

Jocelyn E. Krebs, Elliott S. Goldstein, Stephen T. Kilpatrick. (2011). *Lewin's genes X. Sudbury, Mass: Jones and Bartlett*.

Johnson, G., Banerjee, S., & Putonti, C. (2022). Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Temperate Phages. *MSphere*, 7(1), e01015-21. <https://doi.org/10.1128/msphere.01015-21>.

Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T., & Kuwano, K. (2008). A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF- κ B through protease-activated receptors. *Cellular Microbiology*, 10(7), 1491-1504. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01142.x>.

Lai, B., Yan, H., Wang, M., Li, N., & Shen, D. (2018). A common evolutionary pathway for maintaining quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology*, 56(2), 83-89. <https://doi.org/10.1007/s12275-018-7286-1>.

Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26-41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>.

Li, X.-H., & Lee, J.-H. (2019). Quorum sensing-dependent post-secretional activation of extracellular proteases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 294(51), 19635-19644. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011047>

- Liao, C., Huang, X., Wang, Q., Yao, D., & Lu, W. (2022). Virulence Factors of *Pseudomonas Aeruginosa* and Antivirulence Strategies to Combat Its Drug Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 926758. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926758>.
- Loarca, D., Díaz, D., Quezada, H., Guzmán-Ortiz, A. L., Rebollar-Ruiz, A., Presas, A. M. F., Ramírez-Peris, J., Franco-Cendejas, R., Maeda, T., Wood, T. K., & García-Contreras, R. (2019). Seeding Public Goods Is Essential for Maintaining Cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2322. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02322>.
- Marçais, G., Delcher, A. L., Phillippy, A. M., Coston, R., Salzberg, S. L., & Zimin, A. (2018). MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. *PLOS Computational Biology*, *14*(1), e1005944. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005944>.
- Martínez-Carranza, E., García-Reyes, S., González-Valdez, A., & Soberón-Chávez, G. (2020). Tracking the genome of four *Pseudomonas aeruginosa* isolates that have a defective Las quorum-sensing system, but are still virulent. *Access Microbiology*, *2*(7). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000132>.
- Mavrigh, T. N., & Hatfull, G. F. (2019). Evolution of Superinfection Immunity in Cluster A Mycobacteriophages. *mBio*, *10*(3), e00971-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00971-19>
- Medina, G., Juárez, K., Valderrama, B., & Soberón-Chávez, G. (2003). Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR Transcriptional Regulation of the *rhlAB* Promoter. *Journal of Bacteriology*, *185*(20), 5976-5983. <https://doi.org/10.1128/JB.185.20.5976-5983.2003>.
- Nanda, A. M., Heyer, A., Krämer, C., Grünberger, A., Kohlheyer, D., & Frunzke, J. (2014). Analysis of SOS-Induced Spontaneous Prophage Induction in *Corynebacterium glutamicum* at the Single-Cell Level. *Journal of Bacteriology*, *196*(1), 180-188. <https://doi.org/10.1128/JB.01018-13>.
- Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H., & Quax, W. J. (2012). The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *76*(1), 46-65. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05007-11>.
- Nouwens, A. S., Beatson, S. A., Whitchurch, C. B., Walsh, B. J., Schweizer, H. P., Mattick, J. S., & Cordwell, S. J. (2003). Proteome analysis of extracellular proteins regulated by the las and rhl quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, *149*(5), 1311-1322. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25967-0>.

- Rosazza, T., Eigentler, L., Earl, C., Davidson, F. A., & Stanley-Wall, N. R. (2023). *Bacillus subtilis* extracellular protease production incurs a context-dependent cost. *Molecular Microbiology*, mmi.15110. <https://doi.org/10.1111/mmi.15110>
- Sandoz, K. M., Mitzimberg, S. M., & Schuster, M. (2007). Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(40), 15876-15881. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705653104>.
- Saucedo-Mora, M. A., Castañeda-Tamez, P., Cazares, A., Pérez-Velázquez, J., Hense, B. A., Cazares, D., Figueroa, W., Carballo, M., Guarneros, G., Pérez-Eretza, B., Cruz, N., Nishiyama, Y., Maeda, T., Belmont-Díaz, J. A., Wood, T. K., & García-Contreras, R. (2017). Selection of Functional Quorum Sensing Systems by Lysogenic Bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1669. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01669>
- Schuster, M., & Greenberg, E. P. (2007). Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics*, 8(1), 287. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-287>.
- Simanek, K. A., Taylor, I. R., Richael, E. K., Lasek-Nesselquist, E., Bassler, B. L., & Paczkowski, J. E. (2022). The PqsE-RhIR Interaction Regulates RhIR DNA Binding to Control Virulence Factor Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e02108-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02108-21>.
- Smith, P., & Schuster, M. (2019). Public goods and cheating in microbes. *Current Biology*, 29(11), R442-R447. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.001>
- Smith, P., & Schuster, M. (2022). Antiactivators prevent self-sensing in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(25), e2201242119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2201242119>.
- Soto-Aceves, M. P., Cocotl-Yañez, M., Servín-González, L., & Soberón-Chávez, G. (2021). The Rhl Quorum-Sensing System Is at the Top of the Regulatory Hierarchy under Phosphate-Limiting Conditions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 203(5), e00475-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00475-20>Tang, A., Caballero, A. R., Marquart, M. E., Bierdeman, M. A., & O'Callaghan, R. J. (2018). Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* Small Protease (PASP), a Corneal Virulence Factor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59(15), 5993. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-25834>.
- Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging Infectious Diseases*, 4(4), 551-560.
- West, S. E. H., Schweizer, H. P., Dall, C., Sample, A. K., & Runyen-Janecky, L. J. (1994). Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in

Pseudomonas aeruginosa. *Gene*, 148(1), 81-86. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90237-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90237-2)

Wilder, C. N., Diggle, S. P., & Schuster, M. (2011). Cooperation and cheating in *Pseudomonas aeruginosa*: The roles of the las, rhl and pqs quorum-sensing systems. *The ISME Journal*, 5(8), 1332-1343. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.13>.

Williams, P., & Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: A tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 12(2), 182-191. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.005>.