



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Tesinas de Grado

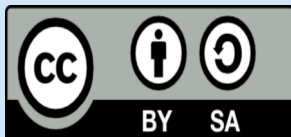
Malena Weinsinger Calvo

Caracterización molecular de un nuevo homólogo de proteínas de unión a ARN de la familia Csr/Rsm presente en bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa*

2024

Instituto de Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.

Atribución – Compartir igual 4.0

<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Weinsinger Calvo, M. (2024). *Caracterización molecular de un nuevo homólogo de proteínas de unión a ARN de la familia Csr/Rsm presente en bacteriófagos de Pseudomonas aeruginosa* [Trabajo final de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. <https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/2959>



INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

Licenciatura en Bioquímica.

“Caracterización molecular de un nuevo homólogo de proteínas de unión a
ARN de la familia Csr/Rsm presente en bacteriófagos de *Pseudomonas
aeruginosa*”.

Alumna: Malena Weinsinger Calvo

Director: Patricio Martín Sobrero

Co-directora: Julieta Mariana Covelli

Fecha de entrega: 18 de Abril de 2024.

Resumen.

Este trabajo indaga acerca de uno de los fenómenos de regulación génica: la regulación post transcripcional. Para ello se sometió al sistema de señalización de dos componentes propio de la familia *Pseudomonas*; el sistema GacA/GacS a complementación fisiológica frente a la falta de uno de sus componentes fundamentales o dos de ellos en distintas cepas mutantes.

En un reciente trabajo del laboratorio de Fisiología y Genética de Bacterias Beneficiosas para las plantas (LFGBBP) del Centro de Bioquímica y Microbiología del Suelo de la Universidad Nacional de Quilmes se llevó adelante un análisis por genómica comparativa para encontrar nuevos parálogos de proteínas de unión a ARN de la familia Csr/Rsm. Mediante este análisis, se describió la presencia de un parálogo llamado RsmM, que presenta una inusual topología estructural y que se encuentra en genomas de *Pseudomonasaeruginosa* en regiones donde está insertado un profago (estado latente de un bacteriofago a través de la inserción del mismo en el genoma de la bacteria hospedadora).

Se obtuvieron resultados donde esta proteína pudo componer el sistema GacA/GacS en cepas mutante de *Pseudomona protegens* actuando como inhibidor de las diferentes proteínas precedidas en su marco de lectura por sitios de unión para proteínas Rsm y tituladas por RNA pequeños miméticos no codificantes.

Se obtuvieron entonces resultados prometedores que plantean un buen indicio para futuras investigaciones de mayor complejidad en la misma línea.

AGRADECIMIENTOS

A todos los y las investigadores de la industria farmacéutica por los favores concedidos.

A Sergio, mi compañero, mi hogar, mi guía y amor.

A las chicas, por confiar en mí cuando no veo ni mis manos.

A todas las amigas que me fueron trayendo por el camino hasta acá.

A Marina y Ceci por amar tanto este país como yo; a la Ludmi por eso y dejarse abrazar.

Al LFGBBP y la Unqui por los mates, los chocolates, las risas y los seminarios. Obvio que a mi director por su generosidad y paciencia infinita, gracias Pato.

A la educación pública por hacerme quien soy, por ser todo lo que nos falta cuando casi no tenemos nada, último bastión del estado presente.

A la UNAJ por quererme dentro y pelear para que no me vaya, a todos sus docentes por su vocación, ética y dedicación. A las Julis, Marias, Tirsos, Rebos, Micas, Lucas y Anitas...

A mi Fede por ser como Stitch (un enano alienígena que no abandona a su familia).

Y a Nati, gracias siempre querida, todos estos años y al final sí llegamos.

Índice

Tabla de Abreviaturas	pág. 4
Introducción e importancia del tema.	pág. 5
Hipótesis y objetivos.	pág. 10
Métodos.	pág.11
Resultados y discusión.	pág. 15
Conclusiones.	pág. 19
Fuentes de información y referencias bibliográficas:	
Anexos:	
I. Gráficos curva de crecimiento Ln DO600 vs Tiempo, UM vs tiempo para ensayos por beta gal.	
II. Fotos de colonias sembradas en agar leche, complementación para exoproteasa.	

Abreviaturas.

ARN	ácido ribonucleico
Csr	regulador de almacenamiento de carbono
GacA/GacS	global activation of antibiotic and cyanide synthesis A
NA	Agar nutritivo
NYB	Nutrient Broth Yeast
<i>P.</i>	<i>Pseudomona</i>
<i>P. p.</i>	<i>Pseudomona protegens</i>
Rsm	represor de metabolitos de fase estacionaria
Grad-seq	gradient profiling by sequencing

Introducción.

La regulación de la expresión génica en bacterias comprende un campo disciplinar de suma importancia; tanto para poder incrementar nuestro conocimiento básico sobre el funcionamiento de la bacterias y su adaptación a su entorno, como para el planteo de nuevas terapias antimicrobianas con impacto en salud humana, animal y vegetal (Sobrero, Valverde (2020)

CsrA/RsmA

El sistema Csr (regulador de almacenamiento de carbono) o Rsm (represor de metabolitos de fase estacionaria) se encuentra entre los sistemas reguladores bacterianos basados en ARN más estudiados. Su componente central, la proteína de unión a ARN CsrA (RsmA), fue descubierta mediante una prueba de mutagénesis de transposones diseñada para identificar reguladores de la expresión genética en la fase estacionaria del crecimiento, utilizando la biosíntesis de glucógeno y la expresión de *glgC*'-'*lacZ* como reporteros. (Romeo, Babitzke(2018)). Se trata de una clase funcional de proteínas de unión a ARN que está implicada en el control postranscripcional de la expresión génica en bacterias (Quendera et al., 2020).

Además, son proteínas reguladoras globales que se unen a los ARNm, generalmente en el sitio de unión de los ribosomas, para controlar la traducción y la estabilidad del ARNm (Agaras, B., Sobrero, P., & Valverde, C. (2013))

Estos polipéptidos están bastante bien conservados y son de longitud relativamente corta (65 a 75 residuos en promedio) que funcionan como homodímeros (Gutiérrez et al., 2005).

Poseen un residuo de arginina fuertemente conservado que es fundamental para el reconocimiento de la primera G del trinucleótido GGA, y su reemplazo elimina la unión reguladora de las proteínas CsrA a sus objetivos de ARN (Heeb et al., 2006 ; Schubert et otros, 2007).

La estrategia antagonista más generalizada para aliviar el control postranscripcional por parte de las proteínas de la familia CsrA es a través de la expresión de ARNs imitadores moleculares (Romeo y Babitzke, 2019).

ARNs pequeños no codificantes miméticos.

El mecanismo de control de los niveles de expresión ejercidos por las proteínas de la familia Csr/Rsm es mediado por ARN pequeños no codificantes miméticos que los desplazan y liberan la regulación sobre ARN mensajeros, al tiempo que el nivel intracelular de estos ARN pequeños es controlado por sistemas de dos componentes (Valverde y Haas, 2008)

De estos ARN antagonistas se encuentran codificados en múltiples copias por genoma, pudiendo existir entre 3 a 5 parálogos. (Sobrero, Valverde (2020))

En *Pseudomonas*, el regulador transcripcional GacA contribuye principalmente a la activación de los promotores que se encuentran río arriba de los genes de los ARN regulatorios (González, Reimann (2008)). El mecanismo antagonista que ofrecen estos pequeños ARN miméticos se basa en la exposición de múltiples sitios de unión para las proteínas represoras, removiendo a las mismas de los ARNm blancos y aliviando la regulación negativa sobre su traducción. La expresión de los ARN regulatorios está subordinada a una regulación transcripcional, a partir de la activación de un sistema de dos componentes (Valverde Hass (2008))

Sistema de dos componentes en *P. protegens* cepa CHA0: GacS/GacA

El sistema GacS/GacA controla la producción de metabolitos secundarios y enzimas extracelulares implicadas en la patogenicidad de plantas y animales, el biocontrol de enfermedades vegetales transmitidas por el suelo, la aptitud ecológica o la tolerancia al estrés. Un modelo actual propone que GacS detecta una señal aún desconocida y activa, mediante un mecanismo de fosforilación, el regulador de transcripción GacA, que a su vez desencadena la expresión de genes diana (Heeb, S., &Haas, D. (2001).

Se trata de una vía de transducción de señales conservada de *P. aeruginosa* que controla la producción de productos extracelulares y factores de virulencia, así como el cambio del estilo de vida planctónico al de biopelículas (Agaras, Sobrero, Valverde 2013)

A partir de estudios transcriptómicos sobre el rol de GacA en diferentes *Pseudomonas*, se ha determinado que alrededor de 10% del genoma de estos microorganismos responde a GacA (Hassan (2010) A pesar de la importancia de estas funciones, los ligandos que se unen al dominio sensor de GacS siguen siendo desconocidos y su identificación es un desafío apasionante en este dominio. En altas densidades de población, la señal de GacS desencadena

un cambio del metabolismo primario al secundario y un cambio en el estilo de vida bacteriano. Se ha sugerido, basándose en estas observaciones, que la señal de GacS es un marcador de la aparición de estrés nutricional y competencia. Las investigaciones bioquímicas aún tienen que caracterizar completamente la señal de GacS. Sin embargo, retratan esta señal como un metabolito de bajo peso molecular, relativamente simple y moderadamente apolar, posiblemente parecido, pero sin embargo diferente, de los ácidos orgánicos alifáticos que actúan como moléculas de señalización con detección de quórum en otras proteobacterias. (

Latour 2020)

En *Pseudomonas*, la actividad de GacS es modulada por al menos otros dos sensores de membrana interna, llamados LadS por "sensor de pérdida de adherencia" y RetS por "regulador de exopolisacárido y sistema de secreción tipo III". LadS y RetS proporcionan un cierto grado de flexibilidad, porque tienen efectos de contrapeso, uno mejora la señalización de GacS, mientras que el otro atenúa esta señalización

La cascada Gac/Rsm es iniciada por el sistema regulador de dos componentes Gac compuesto por el sensor quinasa GacS y su correspondiente regulador de respuesta, GacA. La quinasa GacS responde y detecta una señal no identificada, provocando la activación del regulador transcripcional GacA a través de un mecanismo de fosforilación. La forma activa de la proteína GacA activa posteriormente la transcripción de los ARN pequeños (ARNs) rsmXYZ. Estos ARNs secuestran las proteínas represoras de la traducción Rsm A / E, que bloquean la unión del ribosoma a su sitio de unión en el ARNm de los genes diana implicados en los diferentes metabolismos secundarios a esta cascada, como la biosíntesis de antibióticos, por ejemplo. (Wei, Xue et al., (2013)

En la cepa de biocontrol CHA0 de *Pseudomonas fluorescens*, el sistema de dos componentes GacS/GacA controla positivamente la síntesis de productos extracelulares como el cianuro de hidrógeno, la proteasa y el 2,4-diacetilfloroglucinol, regulando positivamente la transcripción de pequeños ARN reguladores que alivian la inhibición a la traducción mediada por RsmA. (Heeb, Valverde, Haas (2004)

En el cultivo en medios sintéticos, los metabolitos que activan los sistemas de dos componentes no son esenciales para la supervivencia de sus productores y generalmente se producen sólo durante la fase estacionaria, cuando la densidad de población celular es muy alta y el crecimiento bacteriano está restringido (latour 2020). Estos metabolitos de naturaleza desconocida una vez se han acumulado en el caso de *P. protegens* activan GacS.

En la cepa CHA0, el sistema de dos componentes es GacS-GacA quien responde a señales autoinducidas no caracterizadas y promueve la traducción de varios ARNm involucrados en la formación de exoproductos y el control de patógenos de raíces de plantas (antibióticos, lipopéptidos, enzimas líticas extracelulares), aliviando el bloqueo de traducción causado por los dos homólogos de CsrA, RsmA y RsmE. Esto se logra activando la transcripción de los genes *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ*, aumentando así la abundancia intracelular de los tres ARN pequeños no codificantes RsmX, RsmY y RsmZ, que secuestran RsmA y RsmE. Estos ARN pequeños titulan a Rsm. Los ARN pequeños de la familia Csr/Rsm actúan como esponjas de proteínas al ofrecer múltiples motivos secuenciales/estructurales compatibles. La disponibilidad de dímeros de CsrA para unirse a múltiples ARNm está modulada por la concentración intracelular de uno o más de estos ARN pequeños imitadores moleculares. (Sobrero, Valverde, (2020))

En el caso de *P. protegens* CHA0 este sistema controla la expresión de elementos implicados en el biocontrol como compuestos antifúngicos (HCN) o enzimas extracelulares de lipopéptidos (como exoproteasas), genes *hcnA* y *aprA* respectivamente.

RsmM

En las últimas décadas, el estudio de los fagos y profagos que interactúan con *P. aeruginosa* ha sido un campo muy prolífico, posiblemente ligado al potencial uso de terapia fágica para el tratamiento de infecciones (Chegini, 2020)

A pesar de su importancia como patógeno humano y bacteria modelo, faltan datos globales que informen sobre los complejos de ARN/proteína para *P. aeruginosa* y otras *Pseudomonas*. (Gerovac 2021)

Gerovac mediante la técnica Grad-seq en condiciones de condiciones estándar y de depredación de bacteriófagos en *Pseudomonas aeruginosa* identificó ARN no codificantes codificados por fagos (Gerovac, (2021). Mediante una búsqueda en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI con PSI-BLAST utilizando la secuencia CsrA de *Escherichiacoli* como consulta se encontró que 1.2% de los fagos sondeados tenían este tipo de proteína en su genoma. Esta subfamilia de homólogos de proteína tipo Rsm presente en fagos y/o profagos dentro del complejo aeruginosa posee una peculiaridad: las proteínas de la subfamilia RsmM poseen un tamaño superior (13 Kda) a las Rsm promedio (6 Kda), con un claro dominio “núcleo” que contiene la topología y los aminoácidos esenciales para la

interacción con moléculas de ARN y un dominio C-terminal extendido, a la que no se pudo encontrar homología con ninguna proteína en la base de datos dentro del mismo estudio (Valverde, Sobrero (2020)). Por otro lado un estudio resalta la presencia de secuencias homologas codificante para rsmM en 33 cepas diferentes de *P. aureuginosa*, y que 6 de ellas (cerca del 20%) presentan regiones espaciadores en cluster CRISPR-Cas, lo que sugiere estas cepas de *P. aureuginosa* han estado previamente en contacto con el fago y generado una “memoria” previa a la integración del profago en el genoma del hospedador. (Ambroa, (2020))

Siguiendo este curso de descubrimientos, el director de este trabajo final sondeo un genoma en particular buscando este subgrupo de homólogos de Rsm, el genoma de una *P. aureuginosa* denominada *HexIt*, secuenciada por Luján en 2017. La proteína Rsm M es una proteína identificada entonces por Patricio Sobrero en el genoma de la *P. aureuginosa HexIT*, esta cepa fue aislada de suelo contaminado con aceite lubricante del suelo de un taller mecánico en la ciudad de Córdoba. (Luján (2017)).



I Sobrero (2020)

La proteína denominada RsmM, posee un tamaño molecular superior (circa 13 Kda) al de las proteínas Rsm promedio (circa 6 KDa) para el género *Pseudomonas*. RsmM presenta una región N terminal conservada en secuencia y topología típica para una proteína de unión a ARN del tipo Rsm, pero la región C-terminal extendida no presenta homología secuencial con ninguna otra proteína en las bases de datos consultadas. El dominio N-terminal de



2Rsm M alineada con RsmA. Sobrero (2020)

RsmM podría funcionar como una proteína tipo Rsm, sin descartar que el dominio C-terminal repercute sobre la actividad de dicho dominio o de la proteína en sí respecto a RsmA, por ejemplo. (Sobrero (2020))

En la imagen puede verse un modelado de A (cian) superpuesto con M (gris) en el que se ve la zona N terminal coincidiendo en ambas proteínas y una zona C extremadamente superior en tamaño en M comparada con A. (Imagen de Sobrero (2020))

La proteína Rsm M identificada en *P. aeruginosaHext1* se evaluará en el siguiente trabajo por complementación fisiológica frente a Rsm A, ya caracterizada por Agarras, en diferentes cepas mutantes de CHA0 de *P. protegens* descritas por Reinmann. Estas cepas mutantes no poseen la capacidad de síntesis de las proteínas tipo Rsm y pueden o no poseer elementos del sistema de dos componentes para aliviar sus efectos inhibitorios, ARN pequeños miméticos no codificantes, en el apartado de materiales y métodos se describirán las cepas utilizadas más detalladamente, (Agarras (2013); Reinmann, Valverde (2005)).

El objeto de este trabajo final es, en principio, que el estudiante adquiera experiencia y destrezas propias de la profesión bioquímica en este caso orientadas al campo de la investigación, pero que supongan una experiencia relevante en tareas generales de su campo. Para ello se llevarán a cabo ensayos que permitan evaluar a este homólogo de Rsm como son el dosaje de la expresión de ARN mensajeros que puedan ser inhibidos por Rsm, evaluado frente a un Rsm de actividad conocida, A, y un control, el vector para la complementación fisiológica, plásmido vacío, en cepas de *Pseudomonas* mutantes. Mediante ensayos de actividad enzimática de beta galactodisa, actividad exoproteasa o de producción de HCN. A fin de llevar a cabo estos ensayos el estudiante primero tendrá que realizar las tareas necesarias para la obtención vector útil para dicha complementación fisiológica.

Hipótesis y objetivos.

El objetivo principal del trabajo es la caracterización funcional de una proteína homóloga a las proteínas de unión a ARN de la familia Csr/Rsm que se encuentra dentro de un profago en genomas de *P. aeruginosa HexIT*

Como objetivos específico se plantean:

- 1) Construcción de un vector inducible por IPTG y replicativo en *Pseudomonas* (de bajo número de copias) para la expresión ectópica del homólogo rsmM.
- 2) Complementación fisiológica de RsmM en cepas mutantes de *P. protegens* CHA0 que carecen de proteínas de unión a ARN de la familia Csr/Rsm.

Materiales y Métodos.

Cepas de *P. protegens* CHA0 utilizadas en este trabajo.

La cepa *P. protegens* CHA0 tiene eliminado los genes decodifican para las dos proteínas homólogas: RsmA y RsmE (Reimmannet al (2005)). *Pseudomonas* spp. y *E. coli* generalmente se cultivaron en agar nutritivo (NA) y en caldo de levadura nutritivo (NYB) (Valverde et al. , 2003).

CHA 1008 *rsmA::ΩKmrsmE::ΩHgΔgacS*; KmRHgR

CHA 1009 *rsmA::ΩKmrsmE::ΩHg*; KmRHgR

CHA 1007 *rsmA::Ω-Km rsmE::Ω-Hg Δ gacSaprA'-' lacZ*, Km r Hg r

CHA 1021 *rsmA::Ω-Km rsmE::Ω-Hg aprA'-' lacZ, Km r Hg r*
 CHA 1027 *rsmA::Ω-Km rsmE::Ω-Hg hcnA'-' lacZ, Km r Hg r*
 CHA 1028 *rsmA::Ω-Km rsmE::Ω-Hg Δ gacS, hcnA'-' lacZ, Km r Hg r*

- *rsmA* gen que codifica la proteína que inhibe a los mensajeros ARN y evita su transcripción
- *rsmE* gen que codifica la proteína que inhibe a los mensajeros ARN y evita su transcripción
- *gacS* gen que codifica para el componente de membrana del sistema de señalización de dos componentes en *Pseudomonas*.
- *aprA* gen que al ser expresado produce una hexoproteasa
- *hcnA* gen que al ser expresado genera en la bacteria producción de ácido cianhídrico, este es utilizado en *Pseudomonas* para protegerse de hongos.
- *lacZ* gen que al ser expresado produce la betagalactidasa
- Km antibiótico, kanamicina.
- Hg antibiótico, higromicina

(Reimann, Valverde, Kay, Hass (2005)); (Agaras, Sobrero, Valverde (2013)); (Heeb, Blumer y Hass (2002); Iino, Daisuke et al. (2007))

En las cepas de *P. protegens* CHA1007, 1008 y CHA1028 está eliminado el gen *gacS*, que codifica para el receptor de membrana del sistema Gac/Rsm, por tanto en estas cepas no habrá ARNs pequeños miméticos que contra regulen la inhibición producida por las proteínas Rsm, ya sean A o M.

Las cepas de *P. protegens* CHA1021, 1009 y 1027 sí son capaces de producir los ARN pequeños miméticos ya que poseen en gen *gacS*.

Ninguna de las cepas tienen los genes *rsmA* o *rsmE*, por lo que no producen proteínas inhibitorias del sistema Gac/Rsm (Reimann et al. (2005)).

Condiciones de cultivo bacteriano.

Las bacterias se cultivaron en agar nutritivo (NA) y en caldo de levadura nutritivo, ya fuera en placa o caldo de cultivo respectivamente.

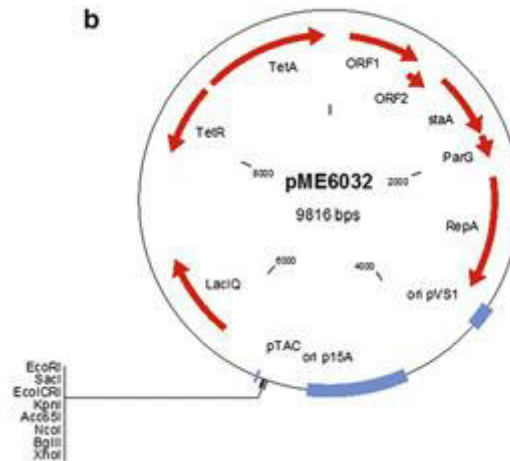
Se agregaron antibióticos cuando fue necesario al medio de crecimiento en las siguientes concentraciones:

Tetraciclina 25 µg/ml para *E. coli* y 125 µg/ml para *P. protegens*.

Kanamicina 25 µg/ml para *P. protegens*.

Las temperaturas de incubación de rutina fueron 37°C para *E. coli* y 28°C para *P. protegens*.

Plásmido ∝ pME 6032



Butt (2016)

Se trata de un vector de clonación derivado de pVS1 . Este vector es estable en condiciones de colonización de raíces en *P.protegens* y es adecuado para generar construcciones estables en condiciones ambientales. (Heeb, 2000; Heeb, 2002)

Construcción de un vector inducible por IPTG

Dentro del plan de trabajo se realizó la inserción del gen *rsmM* en el plásmido estas inserciones fueron evaluadas por electroforesis. El gen *rsmM* se amplificó mediante PCR a partir de un cultivo de la *P. aeruginosa HexIT* secuenciada por Luján (Luján, 2017). Para evaluar los fragmentos obtenidos de material genético se utilizó electroforesis en gel de agarosa. Los cuales fueron revelados con bromuro de etidio, observados y fotografiados en lámpara UV. La construcción con el tamaño adecuado se colectó de la corrida electroforética y se utilizó para transformar químicamente *E. coli*

Para la extracción de plásmido pME6032 (sin inserto) reproducido en *E. coli*, se utilizó el kit de purificación “Puro Plásmido” de la empresa Bio-lógicos ®. El kit provee tubos eppendorf de punta recta de 2 ml con un filtro que permite mediante la incubación y centrifugado con diferentes soluciones para obtener el plásmido a partir del cultivo de *E. coli* en este caso.

El gen *rsmM* y el vector se dirigieron con enzimas de restricción, luego se realizó una inactivación térmica de estas enzimas previa la ligación. Se ligaron los fragmentos obtenidos

y se utilizaron para transformar *E. coli* químicamente, utilizando diferentes temperaturas para favorecer el ingreso del plásmido a través de la membrana, con ellos. Las colonias obtenidas de *E. coli* transformada se plaquearon en medio selectivo NA Tc25ug/ml

El plásmido obtenido con el inserto del gen *rsmM*, fue extraído de estas *E. coli* y se utilizó para transformar las diferentes cepas de *P. protegens* CHA 1007, 1028, 1021, 1027, en estas cepas también se introdujo sobre diferentes cultivos el plásmido vacío y el plásmido con la secuencia *rsmA*, gen para una proteína Rsm ya caracterizada.

Transformación

Se transformaron las *P. protegens* de las distintas cepas para realizar los experimentos de crecimiento, expresión de betagalactosidasa, exoproteasa y HCN.

El plásmido extraído ya sea vacío o con la secuencia *rsmA* o *rsmM* se insertó en cultivos frescos de *P. protegens*. Ya que las diferentes cepas se conservan en criopreservación se descongelaron y realizaron cultivos frescos 24 horas antes de la transformación. De estos cultivos se tomó un ml, se centrifugó y descartó el sobrenadante, agregando glicerol y resuspendieron, para luego centrifugar y descartar el sobrenadante nuevamente. Repitiendo este proceso de lavado tres veces. El pellet obtenido se llevó a un volumen final de 40ul el cual se introdujo gentilmente en la cubeta de electroporación.

Luego se añadieron a la cubeta de 3 a 5ul de plásmido y se sometió a un pulso de a un pulso de 2.00 kW/cm de intensidad. Luego estas bacterias fueron incubadas con medio enriquecido durante una hora a 28°C en *shaker*. Transcurrido este periodo se sembraron en placa cada una de las cepas transformadas por extensión del inóculo hasta su absorción con ayuda de un asa de Digrafsky, estas se llevaron entonces a incubación por 24 a 48 h en estufa a 28°C.

Las cepas transformadas de *P. protegens* CHA 1007; 1028 1021 y 1027 con un plásmido control (sin inserto) \propto pME3062, el mismo plásmido con el gen *rsmA* y también con *rsmM* se conservaron en criopreservación.

Ensayos de medida de β -galactosidasa y crecimiento.

Las cepas transformadas de *P. protegens* CHA0 se conservaron por criopreservación, por lo que se requirió su descongelación y obtención de cultivos frescos previo al desarrollo del ensayo de beta galactosidasa.

Se realizó una siembra por estría de cada cepa transformada y fueron llevadas a estufa por 24 horas, luego se realizaron cultivos líquidos tomando colonias de placa con ansa de siembra y resuspendiendo este inóculo.

Los cultivos líquidos se dejaron en *shaker* durante 24 horas a 28°C. Desde estos cultivos frescos (uno por cepa y plásmido) se tomaron tres muestras que se llevaron a cultivos frescos líquidos sin antibióticos de NyB, luego se tomaron muestras seriadas para evaluar el crecimiento por espectrofotometría en 5 tiempos una vez alcanzada la fase exponencial (aproximadamente a las 10 horas de largados los cultivos). A la par que se tomaban las muestras para evaluar la expresión de la enzima en cada cepa transformada.

Las cepas CHA 1007 y CHA 1021 se midieron con IPTG 0,1 mM y sin él. Las cepas CHA 1028 y CHA1027 con IPTG 0,5mM

La reacción de la enzima beta gal con el sustrato o-nitrofenil-D-galactopiranosido (ONPG) fue medida por espectrofotometría a 450 nm.

De los datos obtenidos del crecimiento de las colonias y de la expresión enzimática se realizaron tablas y gráficas adjuntas.

Cultivo de cepas en Agar leche.

Se descongelaron CHA 1008 y CHA 1009 y se obtuvieron cultivos líquidos frescos de ambos por inoculación en medio NyB con 125 ul/ml de tetraciclina, con incubación durante 24 horas a 28 grados en agitación. Se midió la densidad óptica (Do) de cada cultivo y se realizaron las diluciones necesarias para obtener concentraciones con una concentración de 1DO/ul. Se sembró 5ul por triplicado en placas de agar leche con distintas concentraciones de IPTG en flujo laminar y por triplicado para cada diferente concentración de IPTG.

Concentraciones utilizadas de IPTG: 0.0; 0.01; 0.1;0.5 mM.

Luego se tomó foto de las placas, se midió cada halo y diámetro de la cepa se realizó una razón para cada colonia para evaluar la inhibición de la expresión de la exoproteasa en función de la cepa y la concentración de IPTG.

Medida de la expresión de ácido cianhídrico

Se realizaron cálculos, pesada y diluciones para elaborar la recta patrón según el protocolo de Gewitz 1976, donde se elaboraron disoluciones de KCN para la recta patrón de 0 a 20 uM.

Resultados y discusión.

- Preparación de métodos y materiales para los ensayos experimentales.

Dentro del plan de trabajo se realizó la inserción del gen *rsmM* en el plásmido, pero no fue efectiva, estas fueron evaluadas por electroforesis y no se obtuvieron fragmentos con las inserciones deseadas de ningún tipo. Para resolver este inconveniente el director de este trabajo fin de grado cedió un plásmido con la inserción de interés.

Con respecto a la transformación en algunos casos el pipeteo de los diferentes componentes fue muy rápido lo que a posteriori resultó en que no fuera exitosa la transformación ya que el cambio brusco de presiones entre el diámetro de la pipeta y el contenido de la solución pueden hacer que se estallen los componentes de naturaleza génica, esto fue algo que se corrigió en el transcurso del desarrollo del trabajo final.

Evaluación génica de las construcciones insertas (vectores inducibles por IPTG) en las diferentes cepas.

- Ensayos de betagalactidasa.

La cepa *P.protegens*CHA1028 carece de los ARN pequeños, por lo que no podrá contrarrestar el efecto inhibitorio de las proteínas tipo CrsA/RsmA A y M incorporadas mediante el plásmido por transformación, la producción de la enzima beta galactidasa podemos ver que está limitada por su el efecto inhibitorio de las proteínas Rsm, tanto en el caso de cepa complementada con *rsmA* (A) como de la cepa complementada fisiológicamente con *rsmM*(M).

La cepa 1027 por su parte si posee *gacS* y produce los ARN pequeños quienes contrarrestan el efecto inhibitorio de A y M, puede verse como en un principio permite la expresión de beta gal contrarrestando su acción, pero luego es superada por la cantidad expresada de A y M que la superan; quizás dado que la concentración de IPTG 0,5M es algo elevada y estos ARN pequeños no pueden titular la cantidad de Rsm expresada.

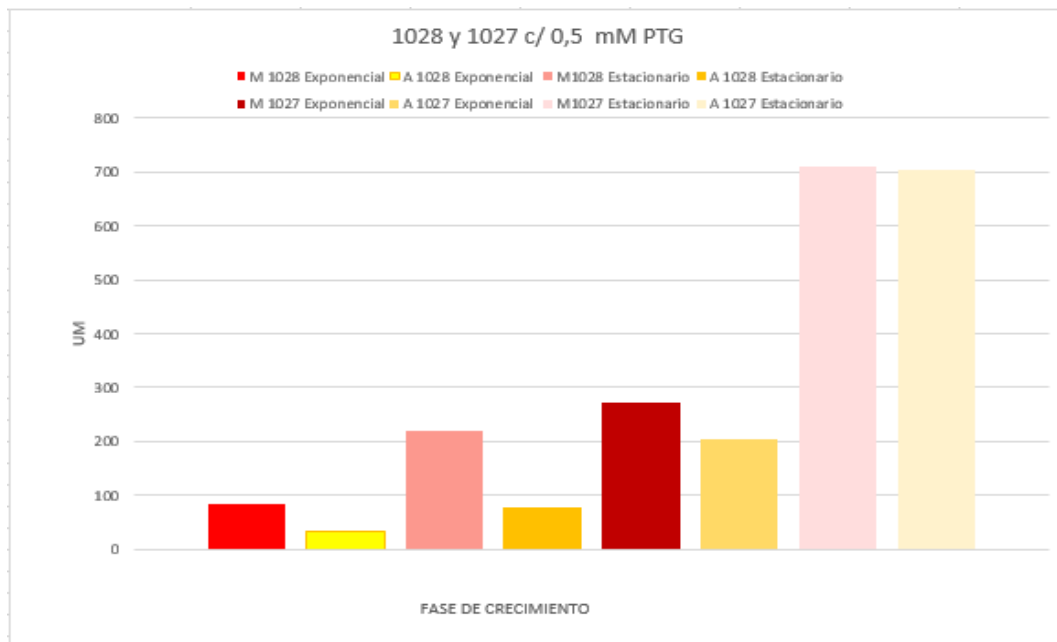
Al comparar la actividad de beta galactidasa en cada cepa bajo las mismas condiciones se observó que se produce entre el doble y el triple de beta galactosidasa que el caso de la cepa 1027 complementada con Rsm A y M respecto a 1028, aunque no alcanza la producción de

la cepa con el plásmido vacío (P), la cual es muy superior a la cepa transformadas de 1027 con Rsm A y Rsm M en fase exponencial.

La producción de ARN pequeños no es completamente lineal y existen relaciones de sinergia y efectos secundarios que escapan a este trabajo final, pero es llamativo como la cepa complementada 1027 ya produce mayor cantidades de betagalactidasa incluso en condiciones exponenciales frente a 1028, cuando es en fase estacionaria que teóricamente actúan los ARN pequeños miméticos.

Además se puede observar que la acción desinhibitoria de los ARN pequeños es más efectiva sobre la cepa 1027 complementada con A que con M. Esto volverá a repetirse en la evaluación de las cepas 1007/1008, lo que puede hacer pensar que la acción inhibitoria de RsmM es mayor que la de RsmA

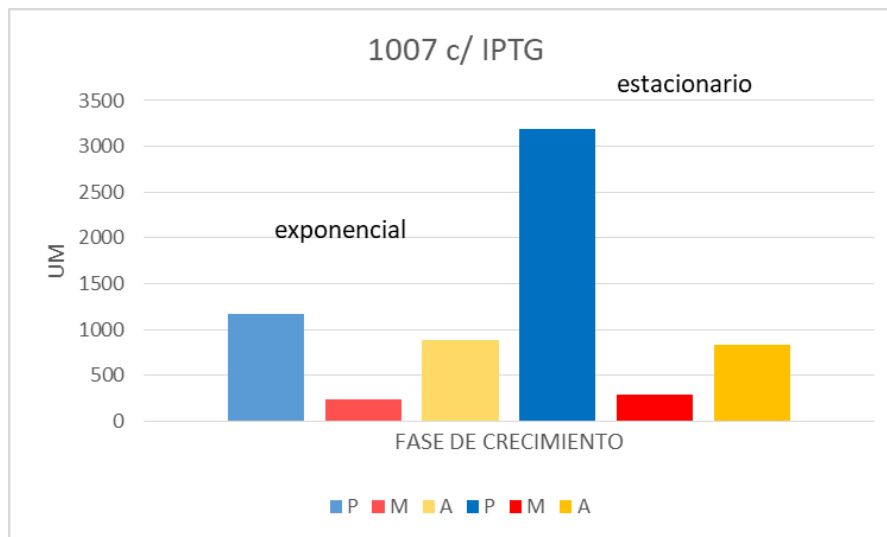
Se considera entonces como una posibilidad que la cantidad de IPTG utilizada fuera algo elevada, concentración de 0,5mM, al observarse como en la cepa 1027 los ARN pequeños producidos no alcanzaban para contrarrestar completamente la acción de A y M, comparándolos con P, por lo que en los siguientes ensayos se realizaron con una concentración de IPTG de 0,1mM.



4Actividad de betagalactidasa en 1028 y 1027 complementadas con RsmM y RsmA a 0,5mM de IPTG

Las cepas 1007 y 1021 se evaluaron con y sin IPTG. Los datos obtenidos no permiten construir una gráfica congruente de actividad beta galactosidasa para 1007 y 1021 sin IPTG, pero si de crecimiento, el equipo o el operador generaron errores groseros. En el caso de 1007

y 1021 con IPTG si pudo observarse un comportamiento acorde a lo esperado. Pese a este inconveniente la principal hipótesis de este trabajo si fue confirmada: M inhibe la expresión de beta gal, funciona como una proteína tipo Rsm. (Ver gráficas en el anexo I).



5Cepa 1007 complementada con pME6032 vacío, RsmM y RsmA C/ 0.1mM de IPTG

Tomando puntos de la zona exponencial y comparándolos con puntos de la fase estacionaria para 1007 en condición de siembra con IPTG de actividad de beta galactosidasa, se puede observar como la inhibición ejercida por las proteínas Rsm A y M no es desinhibida, esta cepa carece de Gac lo cual es congruente, siendo la expresión de la enzima la misma en fase estacionaria y exponencial. Esta expresión proteica no es inhibida completamente ya que el promotor del plásmido tiene una expresión basal mínima. En el caso de la cepa transformada con el plásmido vacío esta no manifestó inhibición en la expresión de la betagalactidasa continuando con su aumento esperado en fase estacionaria.

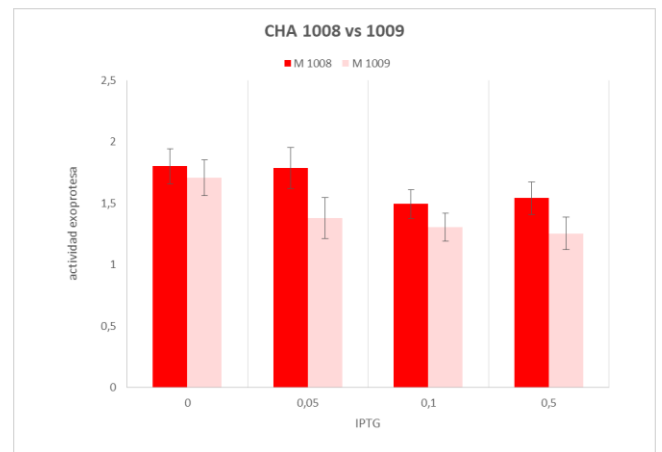
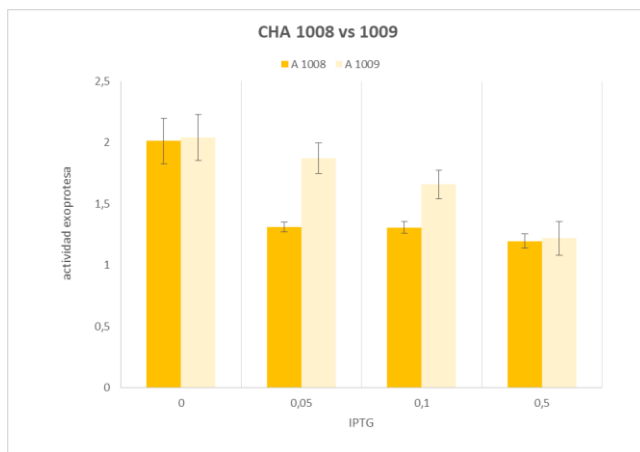
La cepa 1021 con IPTG tiene un comportamiento acorde a los esperado en fases iniciales y exponenciales, no así en fase estacionaria donde cae la producción de beta galactosidasa incluso para la cepa complementada con el plásmido vacío. Esta cepa tiene la capacidad de producir ARN pequeños y se ve cierto aumento de betagalactidasa en los puntos coincidentes con la fase estacionaria para esta cepa complementada con RsmM y RsmA, sin embargo la caída en P no se le pudo encontrar otra explicación más que un error de la técnica.

Evaluación fisiológica de las construcciones insertas en las diferentes cepas.

- Actividad de exoproteasa en cultivos de CHA 1008 y CHA 1009 en agar leche.

En CHA 1009 complementada con *rsmA* a concentraciones de 0,05 y 0,1 M de IPTG los ARN pequeños parecen tener un efecto desinhibitorio sobre la expresión de exoproteasa, mayor en el caso de A que M, pudiendo suponer que la acción inhibitoria de M es mayor y la cantidad de ARN pequeños para titularlos no es suficiente o no disponen de los sitios de complementación adecuados para su secuestro.

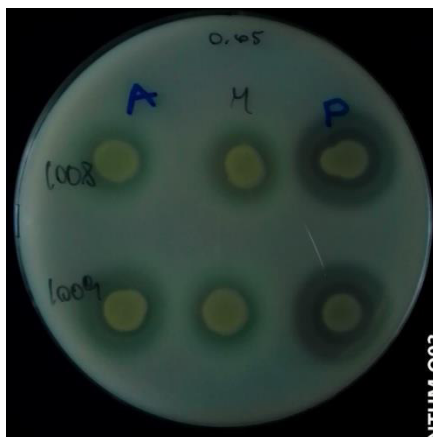
A 0,5 M de IPTG el efecto de la expresión de ARN pequeños en 1009 no es suficiente para contrarrestar el efecto inhibitorio de las proteínas *rsmA* y M, esto también ocurrió cuando se evaluaron 1027 y 1028 con esa concentración de IPTA (0,5M).



7. Actividad exoproteasa de 1008 y 1009 complementadas con *rsmA*

6. Actividad exoproteasa de 1008 y 1009 complementadas con *rsmM*

Con respecto a la inhibición de M se puede observar como en 1008 para concentraciones de entre 0,05 y 0,1 en 1008 parecen ser mayores los halos de M que de 1009 algo contrario a lo esperado ya que carecen de proteínas desinhibitorias, este comportamiento si es el esperado



8 Cultivo de 1008 y 1009 en Agar leche con 0,05mM de IPTG

para A. El tamaño de M es mayor a A y además la cadena de señalización que se está interviniendo no es lineal en sus desencadenantes, por lo que pueden existir otros mecanismos activos que escapan al análisis de este trabajo de grado.

Se podría pensar que M tarda más en sintetizarse que A, más en unirse a su ARN diana y una vez unido es más estable que A por lo que los ARN pequeños no pueden competir con él. M fue obtenida de un profago inserto

en pseudomonas, la desinhibición que ejerce Gac sobre las proteínas Rsm supone un fitness frente a situaciones de estrés como por ejemplo una invasión profágica que este tenga cierta resistencia a los ARN pequeños por sobre los que utiliza la *Pseudomona* podría suponer beneficios para el fago.

- HcnA

Se realizó una recta patrón y mediciones de la muestra pero no se obtuvo señal en el espectrofotómetro, aparentemente por el estado del reactivo KCN. No pudo realizarse una cuantificación cuantitativa de la producción de HCN.No dio coloración la recta patrón realizada acorde a los descrito en métodos. Se utilizó entonces una técnica modificada con concentraciones de 0 a 1ug/ml que tampoco dio coloración detectable a 578nm, por lo que no pudo realizarse la medición de producción de HCN en cultivos frescos por cuestiones de tiempos en el cronograma de trabajo y disponibilidad de materiales (falta de reactivo).

Conclusiones.

Sería interesante repetir las medidas de actividad beta galactosidasa en CHA1007 y CHA1021 con una concentración de IPTG de 0,1M y sin este. Repetir las medidas de CHA1027 y CHA1028 para ver si se repiten las desinhibiciones y caídas de concentración en la producción de beta galactosidasa anómalas. Además sería importante poder realizar la recta patrón para evaluar la producción de ácido cianhídrico en condiciones de complementación fisiológica de cepas de *P. protegens* CHA0 con las proteínas RsmA y M.

Se puede afirmar que RsmM es una proteína con actividad inhibitoria sobre mensajeros de ARN con capacidad traduccional regulados por la familia de las proteínas Crs/Rsm.

El tamaño y estructura de RsmM mayor que RsmA pareciera tener influencia sobre la fortaleza de la ligación sobre el ARN mensajero diana. Poder evaluar la fortaleza de la unión entre RsmA y el sitio diana de ARNm y entre RsmM y los ARN pequeños, así como compararlas con la fortaleza de unión de otras proteínas de familia podría arrojar datos sobre su función y acción así como utilidad a la infectividad de los fagos.

Fuentes de información y referencias bibliográficas.

Agaras, B., Sobrero, P., & Valverde, C. (2013). A CsrA/RsmA translational regulator gene encoded in the replication region of a *Sinorhizobium meliloti* cryptic plasmid complements *Pseudomonas fluorescens* rsmA/E mutants. *Microbiology (Reading, England)*, 159(Pt 2), 230–242. <https://doi.org/10.1099/mic.0.061614-0>

Ambroa A, Blasco L, López-Causapé C, Trastoy R, Fernandez-García L, Bleriot I, Ponce-Alonso M, Pacios O, López M, Cantón R, Kidd TJ, Bou G, Oliver A, Tomás M. 2020. Temperate Bacteriophages (Prophages) in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Belonging to the International Cystic Fibrosis Clone (CC274). *Front Microbiol* 11:1–13.

Butt, A. T., & Titball, R. W. (2016). Functional Analysis of the Role of Toxin-Antitoxin (TA) Loci in Bacterial Persistence. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1333, 121–129. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2854-5_11

Chegini Z, Khoshbayan A, Taati Moghadam M, Farahani I, Jazireian P, Shariati A. 2020. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: A review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. BioMed Central Ltd.

Frangipani, E., Visaggio, D., Heeb, S., Kaeber, V., Cámara, M., Visca, P., & Imperi, F. (2014). The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signalling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental microbiology*, 16(3), 676–688. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12164>

Gerovac, M., Wicke, L., Chihara, K., Schneider, C., Lavigne, R., & Vogel, J. (2021). A Grad-seq View of RNA and Protein Complexes in *Pseudomonas aeruginosa* under Standard and Bacteriophage Predation Conditions. *mBio*, 12(1), e03454-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.03454-20>

Gewitz, H. S., Pistorius, E. K., Voss, H., & Vennesland, B. (1976). Cyanide formation in preparations from *Chlorella vulgaris* Beijerinck: Effect of sonication and amygdalin addition. *Planta*, 131(2), 145–148. <https://doi.org/10.1007/BF00389986>

Guía de estilo de la Asociación Argentina de Microbiología <https://old.aam.org.ar/descarga-archivos/Guia-estilo-2016.pdf>

- Hassan, K. A., Johnson, A., Shaffer, B. T., Ren, Q., Kidarsa, T. A., Elbourne, L. D., Hartney, S., Duboy, R., Goebel, N. C., Zabriskie, T. M., Paulsen, I. T., & Loper, J. E. (2010). Inactivation of the GacA response regulator in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 has far-reaching transcriptomic consequences. *Environmental microbiology*, 12(4), 899–915. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02134.x>
- Heeb, S., & Haas, D. (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 14(12), 1351–1363. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.12.1351>
- Heeb, S., Blumer, C., & Haas, D. (2002). Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of bacteriology*, 184(4), 1046–1056. <https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1046-1056.2002>
- Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O'Gara, F., & Haas, D. (2000). Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 13(2), 232–237. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.232>
- Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O'Gara, F., & Haas, D. (2000). Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 13(2), 232–237. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.2.232>
- Heeb, S., Valverde, C., Gigot-Bonnefoy, C., & Haas, D. (2005). Role of the stress sigma factor RpoS in GacA/RsmA-controlled secondary metabolism and resistance to oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *FEMS microbiology letters*, 243(1), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.008>
- Latour X. (2020). The Evanescent GacS Signal. *Microorganisms*, 8(11), 1746. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111746>
- Luján, A. M., Feliziani, S., & Smania, A. M. (2017). Draft Genome Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Strain Hex1T Isolated from Soils Contaminated with Used Lubricating Oil in Argentina. *Genome announcements*, 5(2), e01473-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01473-16>

Reimann, C., Valverde, C., Kay, E., & Haas, D. (2005). Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Journal of bacteriology*, 187(1), 276–285. <https://doi.org/10.1128/JB.187.1.276-285.2005>

Romeo T. Babitzke P. 2018. Global Regulation by CsrA and Its RNA Antagonists. *Microbiol Spectr* 6:10.1128/microbiolspec.rwr-0009-2017. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.rwr-0009-2017>

Sobrero, P. M., & Valverde, C. (2020). Comparative Genomics and Evolutionary Analysis of RNA-Binding Proteins of the CsrA Family in the Genus *Pseudomonas*. *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 127. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00127>

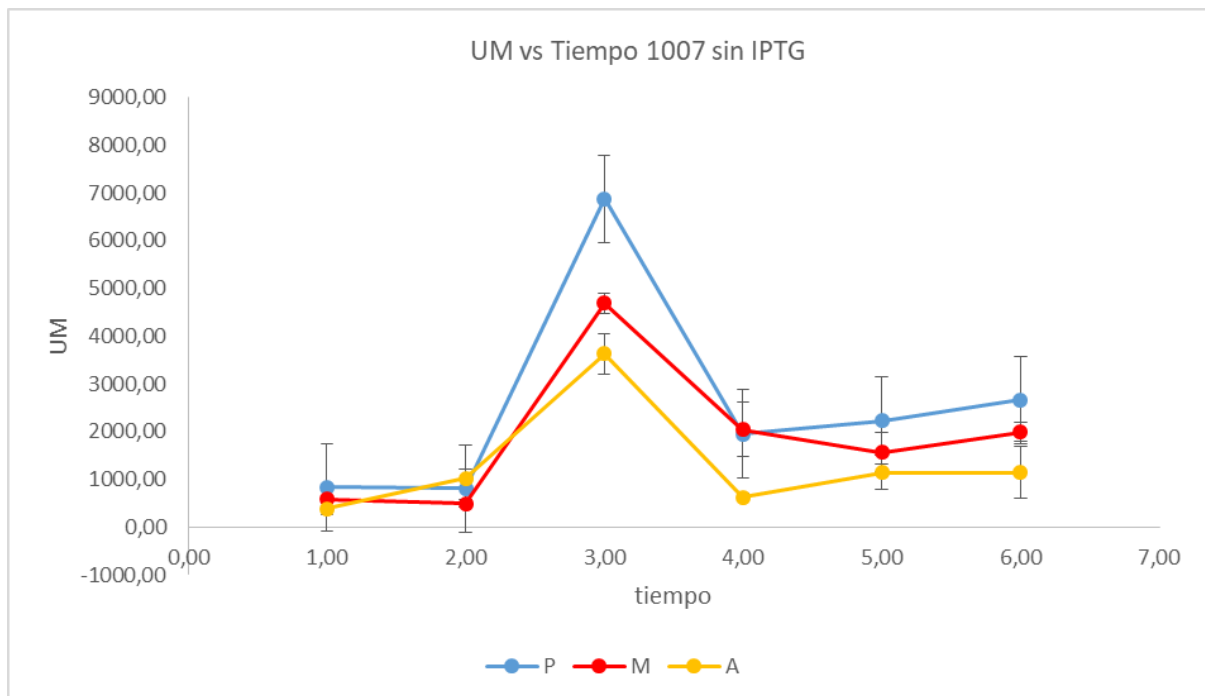
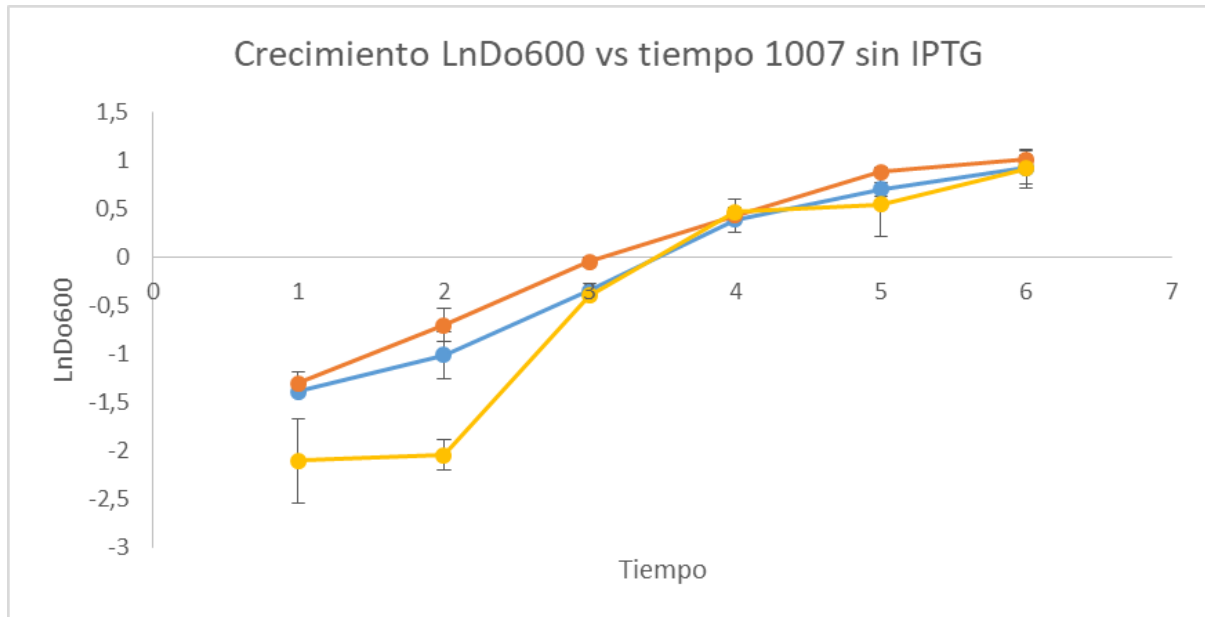
Stephan Heeb, Sarah A. Kuehne, Mark Bycroft, Sorana Crivii, Mark D. Allen, Dieter Haas, Miguel Cámara, Paul Williams, Functional Analysis of the Post-transcriptional Regulator RsmA Reveals a Novel RNA-binding Site, *Journal of Molecular Biology*, Volume 355, Issue 5, 2006, Pages 1026-1036, ISSN 0022-2836, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.11.045>.

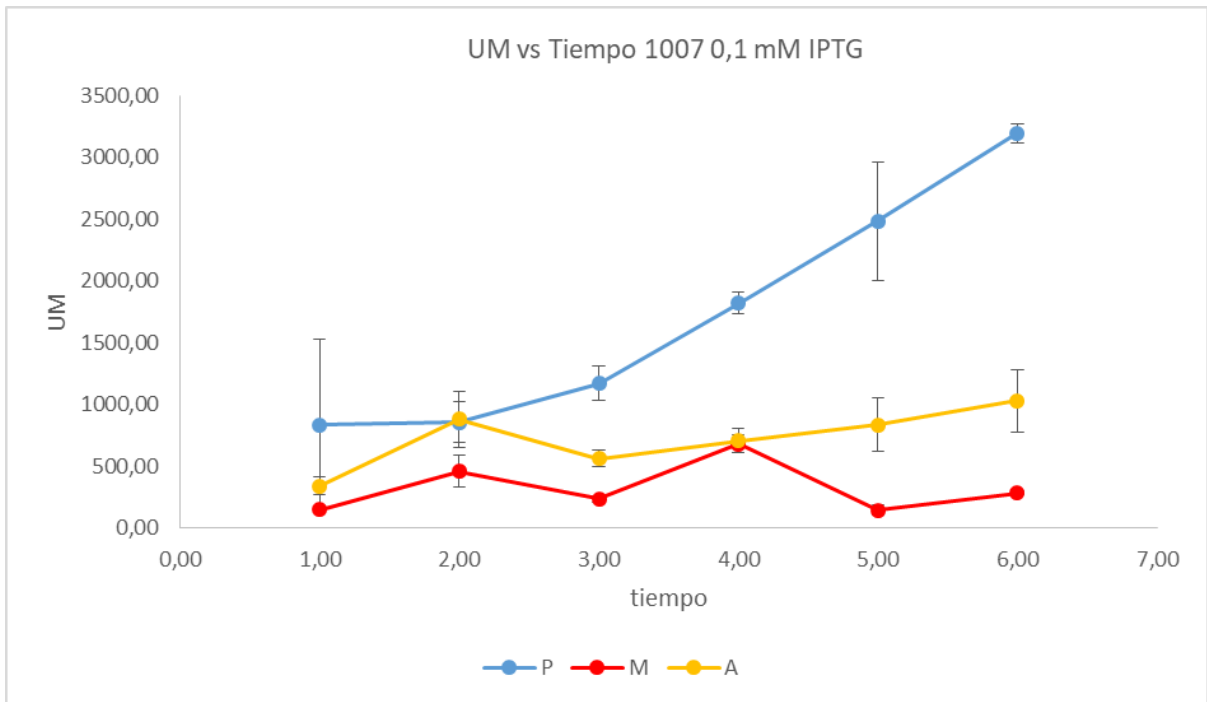
Valverde, C., Heeb, S., Keel, C. and Haas, D. (2003), RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Microbiology*, 50: 1361-1379. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03774.x>

Wei, X., Huang, X., Tang, L., Wu, D., & Xu, Y. (2013). Global control of GacA in secondary metabolism, primary metabolism, secretion systems, and motility in the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* M18. *Journal of bacteriology*, 195(15), 3387–3400. <https://doi.org/10.1128/JB.00214-13>

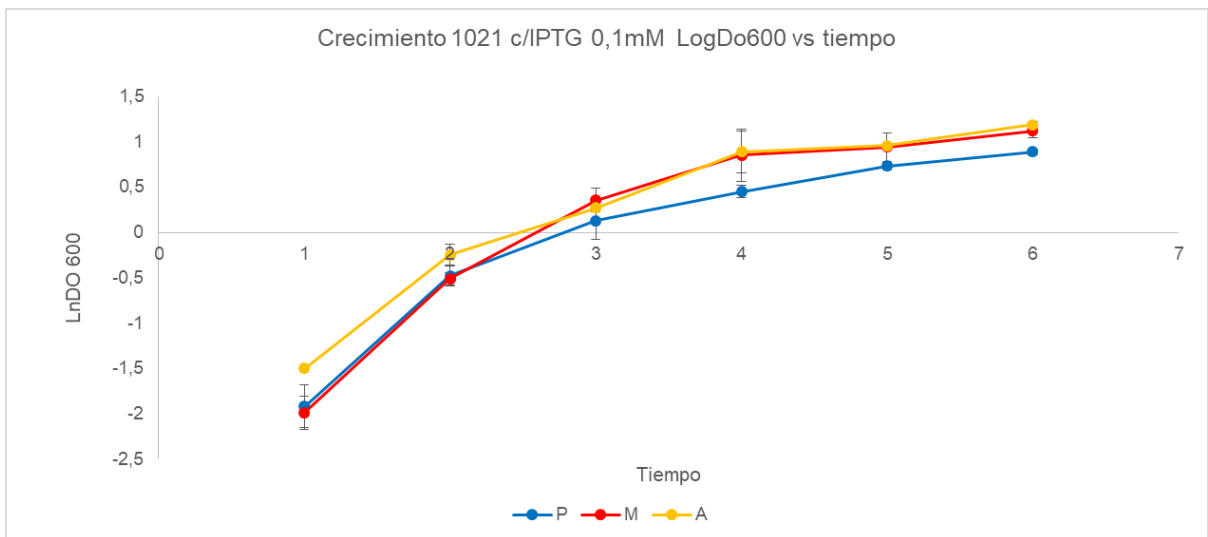
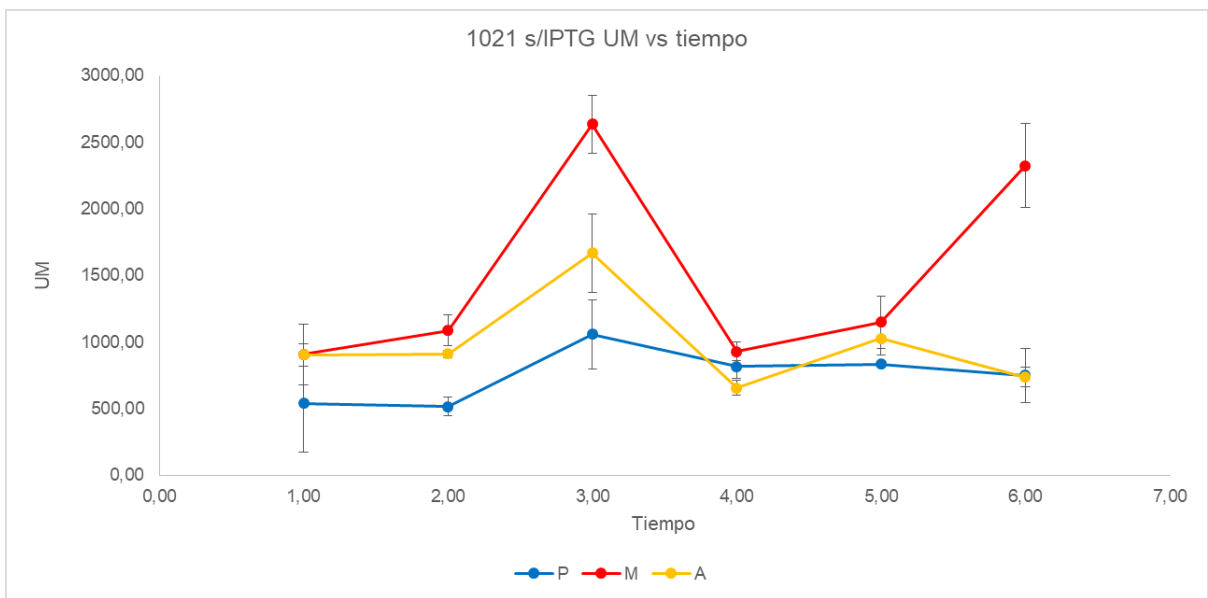
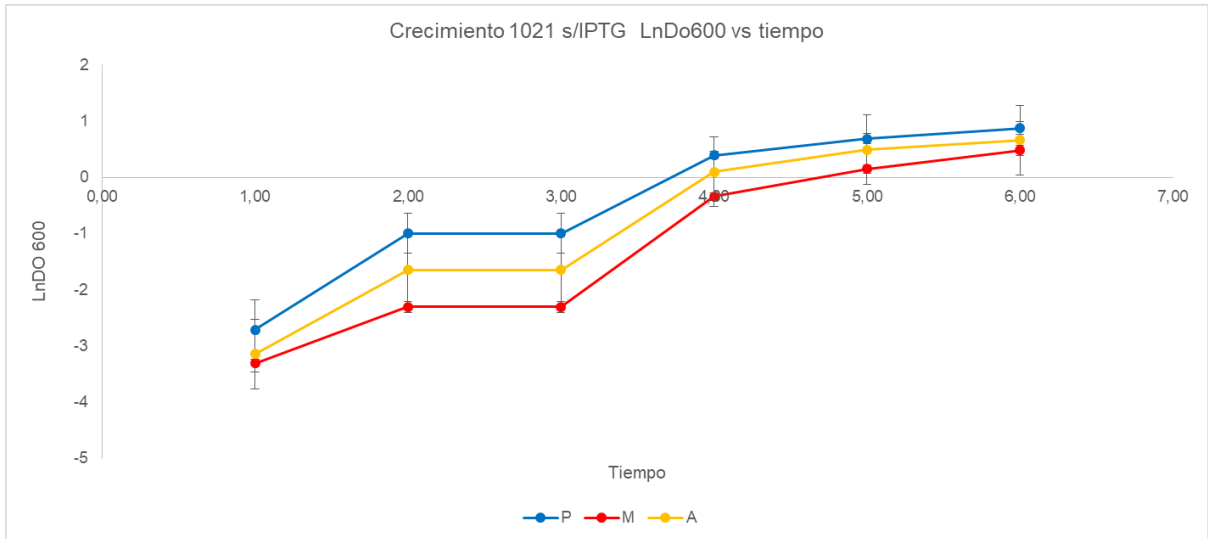
Anexo I: Gráfica obtenidas mediante ensayo con detección espectrofotométrica de actividad de beta gal y densidad óptica en función del tiempo.

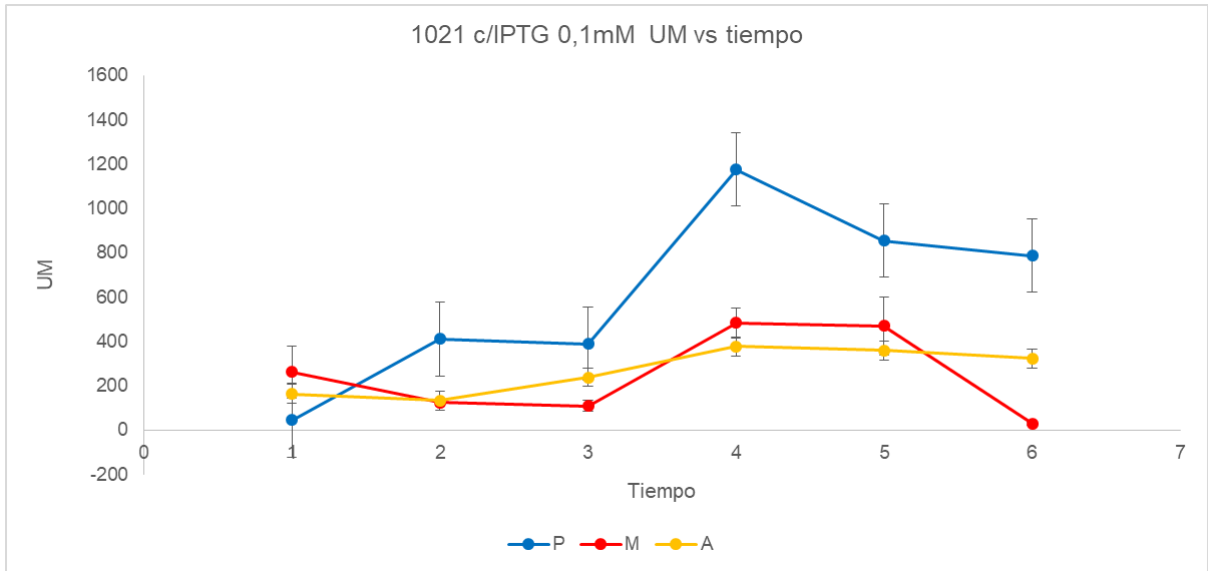
- **1007**



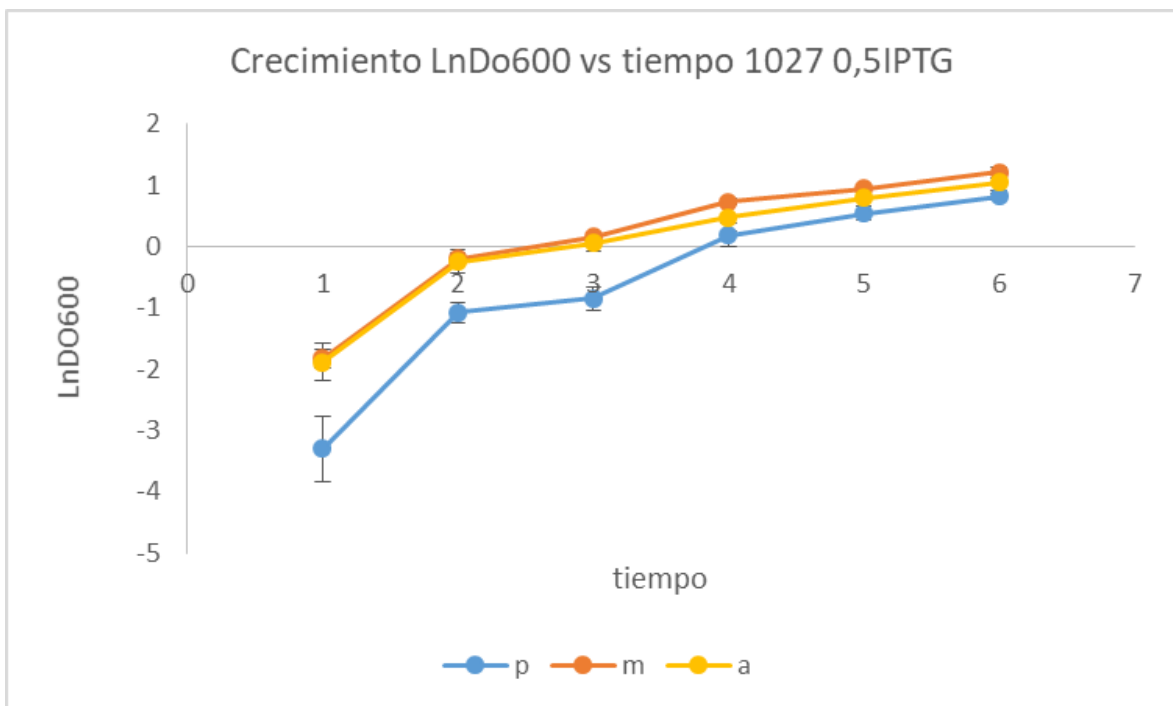


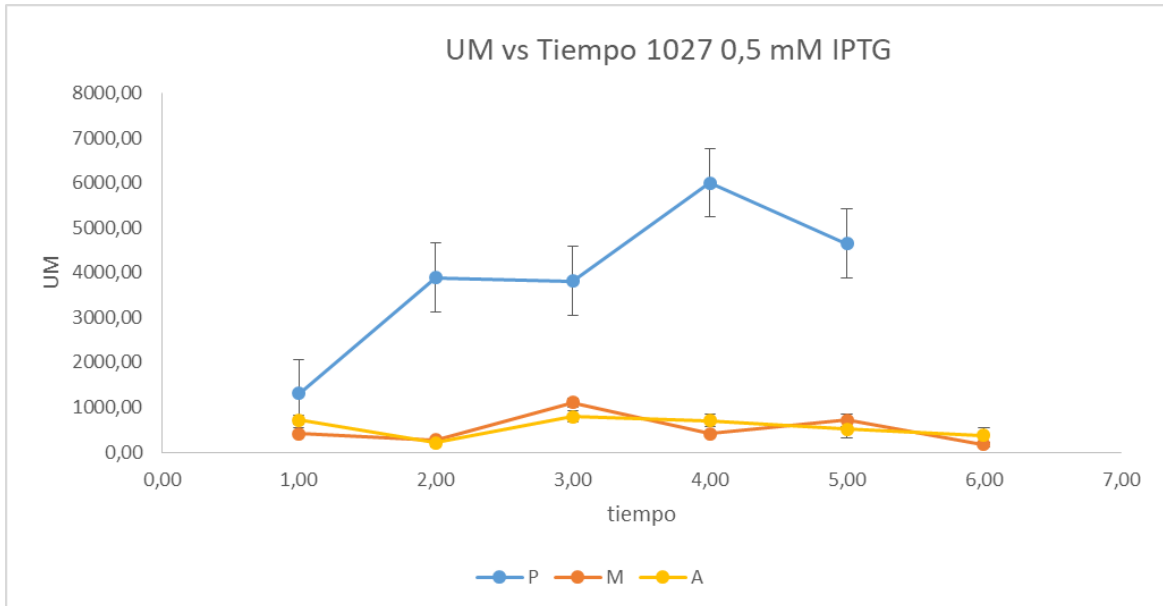
● 1021



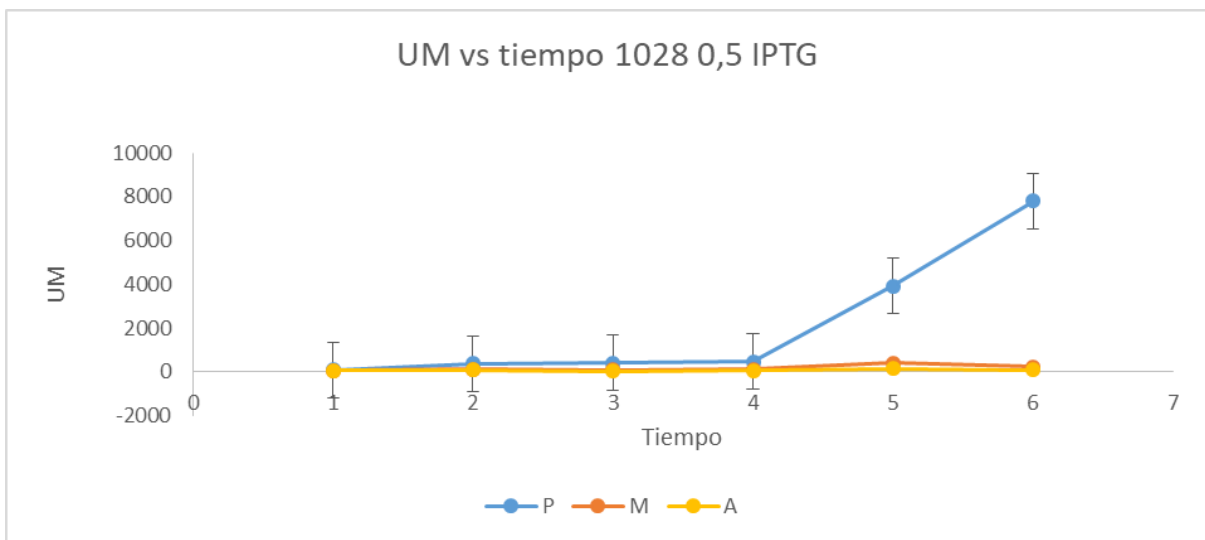
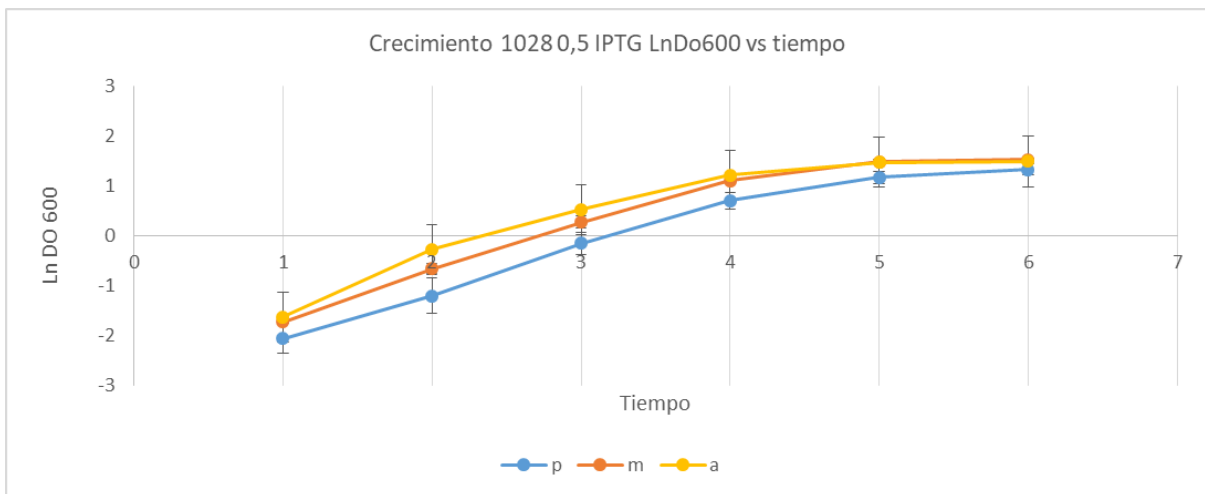


● 1027

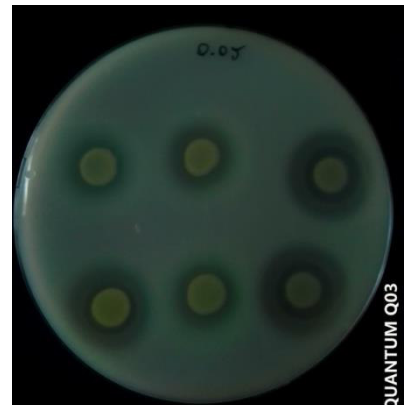
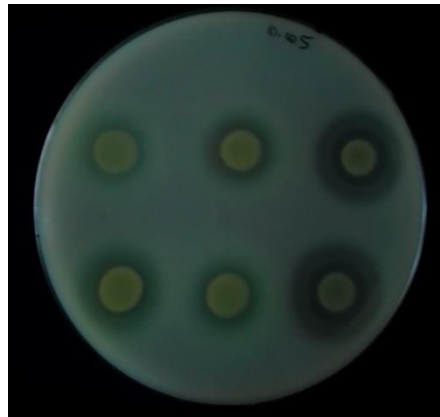
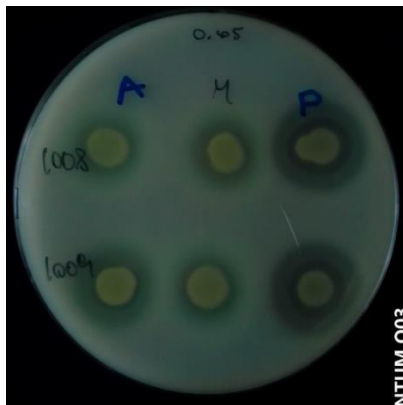
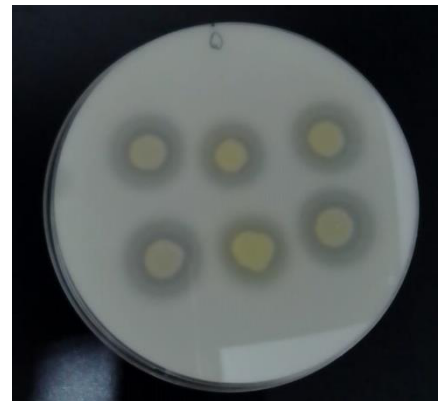
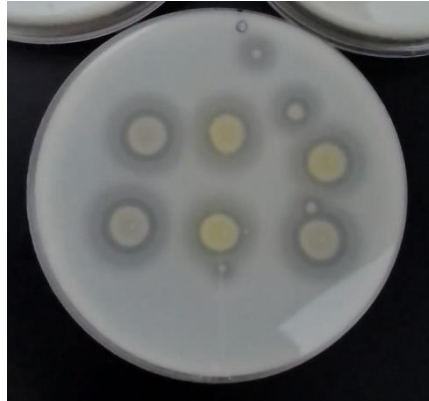
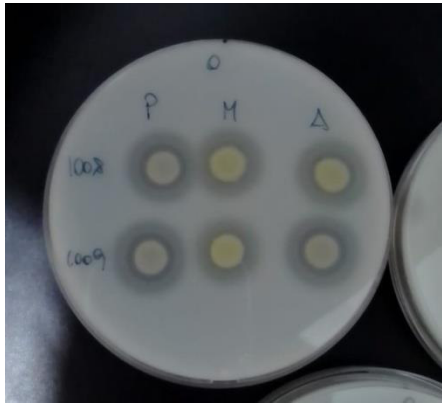




● **1028**

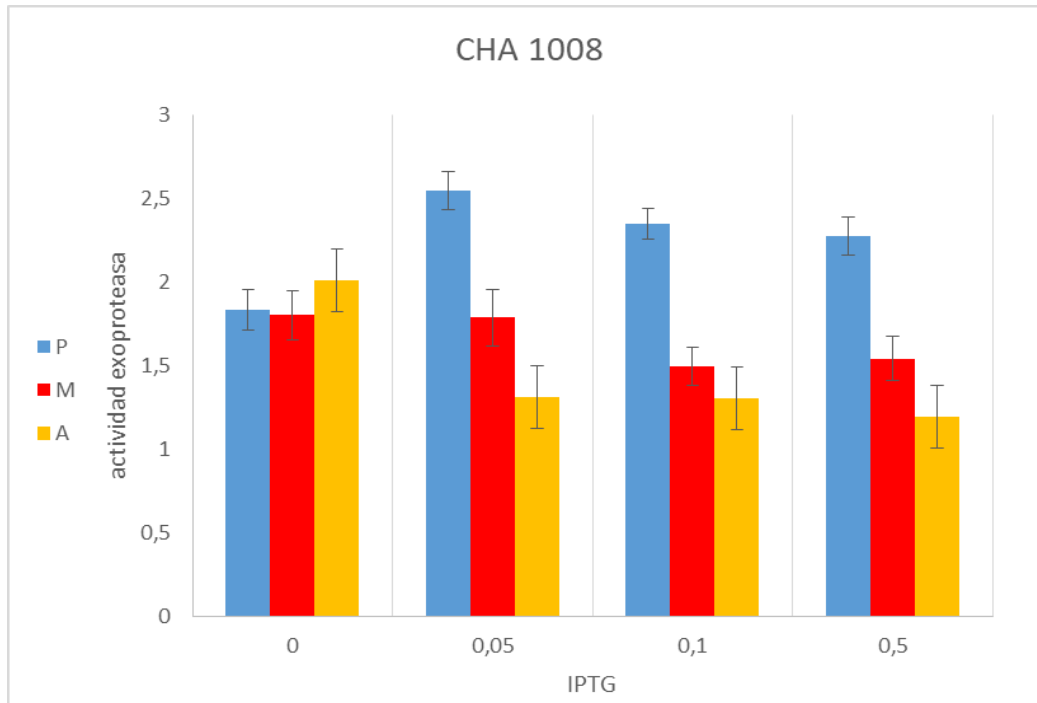


Anexo II: cultivos de cepas 1008 y 1009 en agar leche. con diferentes concentraciones de IPTG



Anexo III: Gráficas obtenidas por la medición de la relación entre el diámetro del halo y el de la colonia como parámetro de la actividad de la exoproteasa que degrada la proteína de la leche presente en el agar leche.

- 1008



- 1009

