



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Expresión génica y regulación transcripcional de los genes *nrd* en bacterias

Domingo Marchan del Pino

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

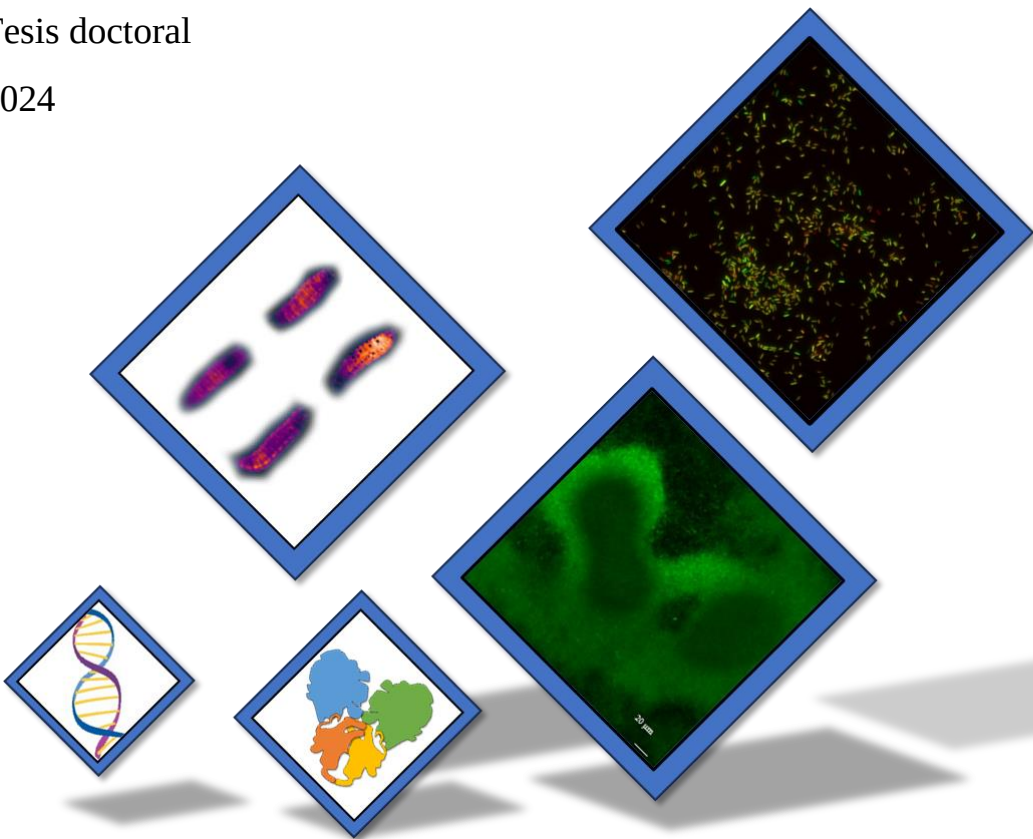
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Expresión génica y regulación transcripcional de los genes *nrd* en bacterias

Domingo Marchan del Pino

Tesis doctoral

2024





UNIVERSITAT DE
BARCELONA



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE BIOLOGÍA, departamento de Genética, Microbiología y
Estadística

Programa de Doctorado de Biomedicina

Expresión génica y regulación transcripcional de los genes *nrd* en bacterias

Memoria presentada por Domingo Marchan del Pino para optar al grado de doctor
por la Universitat de Barcelona

Esta tesis se ha realizado en el Instituto de Bioingeniería de Catalunya (IBEC) en el
grupo de Infecciones Bacterianas y Terapias antimicrobianas (BIAT)

Director y Tutor de la Tesis

Dr. Eduard Torrents Serra

Doctorando

Domingo Marchan del Pino

Domingo Marchan del Pino

Barcelona, 2024

A todos los que me han acompañado en este viaje,

*especialmente a mi **familia...***

Resumen

A lo largo de la historia, el ser humano ha estado en contacto con el mundo microbiano, y un claro ejemplo de ello son las bacterias, causantes de diversas enfermedades infecciosas, aunque en otras ocasiones beneficiosas para nuestro organismo. El descubrimiento de los antibióticos marcó un hito en el tratamiento de estas infecciones, constituyendo la primera revolución en el tratamiento de las mismas. Sin embargo, en la actualidad, se hace cada vez más imperativo el desarrollo de nuevas metodologías para abordar y estudiar diferentes microorganismos patógenos, dado que estos pueden generar resistencia a los antibióticos disponibles. Aunque las nuevas generaciones de antibióticos son más sofisticadas y efectivas, están surgiendo bacterias multirresistentes que pueden evadir casi cualquier tipo de tratamiento antibiótico, lo que representa un gran desafío para la salud pública y la medicina moderna. En este contexto, se buscan nuevas alternativas que actúen en dianas antimicrobianas diferentes a los antibióticos convencionales. Por lo tanto, se requiere una comprensión a nivel molecular de los patógenos bacterianos para diseñar terapias dirigidas a objetivos moleculares previamente desconocidos o distintos de los abordados por los antibióticos actuales.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa multirresistente que codifica en su genoma las ribonucleótido reductasas (RNRs), enzimas encargadas de suministrar los desoxirribonucleótidos (dNTPs) necesarios para la síntesis y reparación del ADN. Estas enzimas se han considerado como dianas antimicrobianas en estudios recientes. Aunque en eucariotas sólo se encuentra codificada la RNR de clase Ia, eubacterias como *P. aeruginosa*, presentan las tres clases de RNR (clase I, II y III), lo que le confiere una gran versatilidad para adaptarse a diferentes ambientes, ya que cada clase tiene unas características que favorecen su actividad en diversas condiciones ambientales. En las últimas décadas, se han identificado varios factores transcripcionales que regulan la expresión génica de las RNR. Uno de estos factores es NrdR, capaz de reprimir todas las clases de RNR, aunque su regulación es incierta. Además, *P. aeruginosa* tiene capacidad de formar biopelículas o biofilms, donde suele haber un gradiente en la concentración de oxígeno, por lo que es interesante ver cómo puede cambiar la expresión génica de múltiples genes de forma simultánea.

En este estudio, nos proponemos profundizar en el conocimiento de la expresión génica y la regulación transcripcional de los genes *nrd* en bacterias. Por un lado, buscamos los factores transcripcionales asociados a la regulación de la expresión génica del gen regulador de las RNR, *nrdR*. Hemos demostrado que FleQ regula el gen *nrdR* al unirse a la caja de unión FleQ Box bajo diferentes condiciones oxigénicas (aeróbicas y anaeróbicas) y durante la formación de biofilm bacteriano.

También evaluamos el papel de FleQ durante la infección en el *modelo in vivo* de *Galleria mellonella*.

Además, hemos desarrollado un sistema que combina el uso de un casete sintético llamado GLOW, que codifica para proteínas fluorescentes como genes reporteros, con plásmidos que pueden permanecer en el citoplasma de la bacteria o insertarse cromosómicamente en el genoma bacteriano. Probamos este sistema en diferentes condiciones comúnmente descritas en la expresión génica en bacterias, utilizando para ello los promotores génicos de las distintas RNRs de *P. aeruginosa* estudiados en nuestro laboratorio, obteniendo resultados similares a los previamente obtenidos y corroborando la utilidad de nuestro sistema.

En conclusión, el entendimiento de la regulación transcripcional del gen *nrdR* es fundamental y se encuentra un poco más completo gracias a al papel que efectúa el factor transcripcional FleQ. Además, demostramos que el sistema de plásmidos que contiene el casete GLOW es una herramienta efectiva y fácil para estudiar simultáneamente varios genes bacterianos mediante proteínas fluorescentes bajo condiciones ambientales dinámicas.

Abstract

Throughout history, humans have been in constant contact with the microbial world. Bacteria, for example, are the causative agents of various infectious diseases, but in other cases, they can be beneficial to our organism. The discovery of antibiotics marked a milestone in the treatment of these infections, constituting the first revolution in their management. However, nowadays, the development of new methodologies to address and study different pathogenic microorganisms is becoming increasingly imperative, as these can generate resistance to available antibiotics. Although new generations of antibiotics are more sophisticated and effective, multidrug-resistant bacteria are emerging that can evade almost any type of antibiotic treatment, posing a major challenge to public health and modern medicine. In this context, new alternatives are being sought that act on antimicrobial targets different from conventional antibiotics. Therefore, a molecular-level understanding of bacterial pathogens is required to design targeted therapies aimed at previously unknown or distinct molecular targets from those addressed by current antibiotics.

Pseudomonas aeruginosa is a multidrug-resistant Gram-negative bacterium that encodes ribonucleotide reductases (RNRs) in its genome. RNRs are enzymes responsible for supplying the deoxynucleotides (dNTPs) necessary for DNA synthesis and repair. These enzymes have been considered as antimicrobial targets in recent studies. While eukaryotes only encode class Ia RNR, eubacteria such as *P. aeruginosa* present the three classes of RNR (class I, II, and III), which gives them great versatility to adapt to different environments, as each class has characteristics that favor their activity under diverse environmental conditions. In recent decades, several transcription factors have been identified that regulate the gene expression of RNRs. One of these factors is NrdR, capable of repressing all classes of RNR, although its regulation is uncertain. In addition, *P. aeruginosa* has the ability to form biofilms, where there is often an oxygen concentration gradient, so it is interesting to see how the gene expression of multiple genes can change simultaneously.

In this study, we propose to deepen our understanding of the gene expression and transcriptional regulation of *nrd* genes in bacteria. On the one hand, we are looking for the transcription factors associated with the regulation of gene expression of the RNR regulator gene, *nrdR*. We have shown that FleQ regulates the *nrdR* gene by binding to the FleQ Box under different oxygen conditions (aerobic and anaerobic) and during bacterial biofilm formation. We also evaluated the role of FleQ during infection in the *Galleria mellonella* *in vivo* model.

In addition, we have developed a system that combines the use of a synthetic cassette called GLOW, which encodes fluorescent proteins as reporter genes, with

plasmids that can remain in the bacterial cytoplasm or be chromosomally inserted into the bacterial genome. We tested this system under different conditions commonly described in gene expression in bacteria, using for this purpose the gene promoters of the different *P. aeruginosa* RNRs studied in our laboratory, obtaining results similar to those previously obtained and corroborating the usefulness of our system.

In conclusion, understanding the transcriptional regulation of the *nrdR* gene is fundamental and is now a little more complete thanks to the role played by the transcription factor FleQ. In addition, we demonstrate that the plasmid system containing the GLOW cassette is an effective and easy tool for simultaneously studying several bacterial genes using fluorescent proteins under dynamic environmental conditions.

Índice

Resumen.....	III
Abstract.....	V
Índice	VII
Listado de figuras.....	X
Listado de tablas	XII
Lista de Abreviaturas	XIII
Introducción	1
1. Ribonucleotidil reductasas	1
1.1 La enzima ribonucleotidil reductasa	1
1.1.1 Clases de ribonucleotidil reductasas	1
1.1.2 Regulación alostérica	3
1.1.3 Mecanismos catalíticos de las ribonucleotidil reductasas	5
1.2 Las RNR de clase I	6
1.3 Las RNR de clase II	8
1.4 Las RNR de clase III.....	10
1.5 Distribución de las RNR y significado ecológico	11
1.6 Las RNRs de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i>	13
1.7 Regulación de la expresión génica de las ribonucleotidil reductasas.....	15
1.7.1 Regulación transcripcional.....	15
1.7.2 Regulación mediada por riboswitch.....	19
2. El factor transcripcional NrdR	21
2.1 Aspectos generales del factor transcripcional NrdR	21
2.2 Descubrimiento y contexto de <i>nrdR</i> en el genoma bacteriano.....	21
2.3 Cajas de unión a NrdR	23
2.4 Estructura y función de NrdR	24
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
3.1 Descripción general	26
3.2 Relevancia medioambiental	27

3.3 Relevancia clínica	27
3.3.1 Infección, enfermedades y tratamiento de <i>P. aeruginosa</i>	29
3.4 Factores de virulencia asociados a <i>P. aeruginosa</i>	31
3.4.1 Biofilm: matriz y formación	34
3.5 Sistemas y problemas en la tinción diferencial para el estudio de biofilms bacterianos. Plásmidos y proteínas fluorescentes	35
3.6 <i>Galleria mellonella</i> como organismo modelo de infección	37
Hipótesis y Objetivos	41
Metodología	42
Resultados	43
Capítulo 1: FleQ controls gene expression of <i>nrdR</i> , the master regulator of ribonucleotide reductases in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Abstract	45
Introduction.....	46
Materials and methods	48
Results	54
Discussion	66
References	74
Capítulo 2: Novel Fluorescent Reporter Vectors for Monitoring Bacterial Promoter Activity under different environmental condition.....	89
Abstract	90
Introduction.....	91
Materials and methods	94
Results and Discussion	99
Discusión	123
Regulación génica de NrdR mediante factores transcripcionales	123
Un nuevo factor transcripcional hipotético en la regulación de <i>nrdR</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.	128
DnaA como posible regulador transcripcional de <i>nrdR</i> en <i>E. coli</i> K12 MG1655.	130
Diseño y desarrollo de una batería de vectores que presentan un casete sintético para la monitorización de la expresión génica en bacterias	135

Conclusiones	140
Bibliografía	142

Listado de figuras

Figura 1: Esquema simplificado de la reacción enzimática realizada por las RNR .	1
Figura 2: Esquema general para la regulación alostérica de la RNR de clase Ia.	3
Figura 3: Esquema simplificado del mecanismo de acción de las RNR.....	5
Figura 4: Mecanismo de reducción de las cisteínas del centro activo de las RNR mediante las tiorredoxinas y las glutarredoxinas	6
Figura 5: Estructura de la RNR de clase Ia de <i>E. coli</i>	7
Figura 6: Estructura de la RNR de clase II de <i>Lactobacillus leichmannii</i> y <i>Thermotoga maritima</i>	9
Figura 7: Estructura de la RNR de clase III del bacteriófago T4.....	11
Figura 8: Distribución de las RNR dependiendo de su actividad bajo diferentes condiciones de oxígeno y en función de la concurrencia en organismos.....	13
Figura 10: Esquema de la regulación transcripcional de las RNR presentes en <i>P. aeruginosa</i>	19
Figura 11: Funcionamiento de la estructura secundaria del ARNm correspondiente al riboswitch de la RNR de clase Ia en <i>S. coelicolor</i>	20
Figura 12: Ejemplos de la organización de los operones que contienen el gen <i>nrdR</i> en diferentes microorganismos	22
Figura 13: Hipótesis sobre el mecanismo de acción de NrdR	25
Figura 15: Factores de virulencia presentes en <i>P. aeruginosa</i>	32
Figura 16: Etapas de la formación de un biofilm bacteriano	35
Figura 17: Esquema del funcionamiento de los vectores usados para la expresión de proteínas fluorescentes en bacterias	36
Figura 18: Anatomía general de la larva de <i>Galleria mellonella</i>	40
Figura 19: Funcionamiento de la regulación mediada por FleQ	124
Figura 20: Expresión transcripcional de <i>nrdR</i> y mutagénesis dirigida de las cajas hipotéticas para un factor transcripcional aún no identificado en <i>P. aeruginosa</i> PAO1	130
Figura 22: Región promotora del gen <i>nrdR</i> en <i>E. coli</i> K-12 MG1655 e identificación bioinformática de factores transcripcionales asociados a su promotor	133
Figura 23: Expresión transcripcional del gen <i>nrdR</i> de <i>E. coli</i> K-12 MG1655	134

Listado de tablas

Tabla 1: Principales características de las RNR.....	2
Tabla 2: Lista de patógenos prioritarios para I+D de nuevos antibióticos.....	28
Tabla 3: Resistencia antibiótica de <i>P. aeruginosa</i>	31
Tabla 4: Principales organismos testados en <i>G. mellonella</i>	38

Lista de Abreviaturas

(d)NMP	(desoxy)ribonucleótido monofosfato
(d)NDP	(desoxy)ribonucleótido difosfato
(d)NTP	(desoxy)ribonucleótido trifosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ADN	Ácido desoxyribonucleico
Mpb	Mega pares de bases
RNR	Ribonucleotidil reductasa
AdoCbl	5'adenosilcobalamina
SAM	S-adenosilmetionina
pb	Pares de bases
TSS	Sitio de inicio de la transcripción
mARN	ARN mensajero
UTR	<i>Untranslated region</i> , región no traducida
LPS	Lipopolisacárido
ORF	<i>Open reading frame</i> , marco abierto de lectura
LPS	Lipopolisacárido
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
T3SS	Sistema de secreción de tipo III
Cryo-EM	<i>Cryo-electron microscopy</i>
EPOC	Enfermedades obstructivas crónicas pulmonares
FQ	Fibrosis quística
QS	<i>quorum sensing</i>
eADN	ADN extracelular

EPS	Sustancia polimérica extracelular
PF	Proteínas fluorescentes
GFP	Green fluorescent protein

Introducción

1. Ribonucleotidil reductasas

1.1 La enzima ribonucleotidil reductasa

En los organismos vivos existen múltiples genes esenciales para la supervivencia de estos. Uno de estos genes esenciales, son los que codifican para las enzimas ribonucleotidil reductasas (RNR). Estas enzimas fueron aisladas y caracterizadas enzimáticamente por el Prof. Peter Reichard en 1960¹, y el primer operón que codifica para una RNR fue clonado y secuenciado en 1984² por J.A. Fuchs.

Las RNR son metaloenzimas esenciales para la producción *de novo* de los precursores para la síntesis y reparación del ADN, que hacen posible la división celular bacteriana, ya que estas son capaces de reducir los ribonucleótidos (NDP/NTP) a sus correspondientes desoxirribonucleótidos (dNDP/dNTP)³. Básicamente el mecanismo de acción de estas enzimas es la reducción del grupo 2'-OH de los NTP a un hidrógeno en los dNTP (Figura 1).

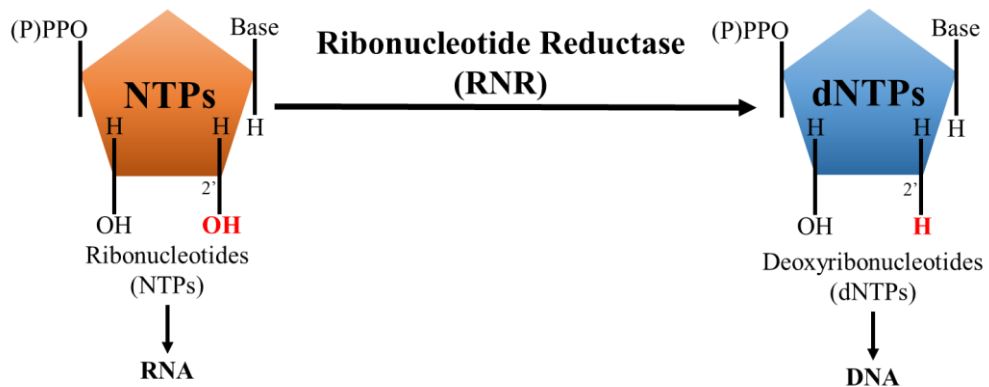


Figura 1: Esquema simplificado de la reacción enzimática realizada por las RNR.

1.1.1 Clases de ribonucleotidil reductasas

En la actualidad las RNR se clasifican principalmente en tres clases diferentes: clase I, clase II y clase III. Su clasificación se realizó según las siguientes características descritas en la Tabla 1: la generación del radical, su estructura

tridimensional, el cofactor necesario para su activación, el centro metálico que presentan y su dependencia o no al oxígeno para realizar su actividad enzimática. Todo y ser enzimas que realizan la misma función, sus estructuras primarias sólo presentan un 20 % de identidad⁴ entre las diferentes clases, lo que hace pensar que, si bien parten de un ancestro común^{5,6}, el paso del tiempo junto al mecanismo de evolución, hicieron aparecer distintas clases que podrían desempeñar funciones similares, pero en condiciones ambientales distintas. Todo ello podría suponer una ventaja evolutiva frente a organismos que no presentan un tipo u otro de RNRs.

Tabla 1: Principales características de las RNR. Adaptada de⁶

	Clase I					Clase II	Clase III
Distribución	Eubacterias y Eucariotas					Archeas, Eubacterias y <i>Euglena</i>	Archeas y Eubacterias
Actividad	Aerobia					Aerobia y Anaerobia	Anaerobia
Sustrato	NDP					NDP y NTP	NTP
Subclase	clase Ia	clase Ic	clase Id	clase Ib	clase Ie		
Genes	<i>nrdAB</i>			<i>nrd(HI)EF</i>		<i>nrdJ</i>	<i>nrdDG</i>
Subunidad catalítica	NrdA (α)			NrdE (α)		NrdJ (α)	NrdD (α)
Subunidad activadora	NrdB (β)			NrdF (β)			
Proteína activadora				NrdI			NrdG (β)
Estructura	$\alpha_2\beta_2/\alpha_6\beta_6$			$\alpha_2\beta_2$		α/α_2	$\alpha_2+\beta_2$
Transferencia del radical	Tyr -> Cys	Phe -> Cys	Tyr -> Cys	Tyr -> Cys	DOPA -> Cys	AdoCbl -> Cys	AMet -> Gly -> Cys
Centro metálico	Fe ^{III} /Fe ^{III}	Mn ^{II} /Fe ^{III}	Mn ^{III} /Mn ^{IV}	Fe ^{III} /Fe ^{III} Mn ^{III} /Mn ^{III}		AdoCbl (Co)	SAM (Fe ^{IV} /S ^{IV})
Donador de electrones	Tiorredoxina y Glutarredoxina			NrdH-Redoxina		Tiorredoxina	Formato y Tiorredoxina

Las diferentes clases de RNR fueron descubiertas y descritas de forma secuencial y estableciéndose enzimas “prototipo” que permitieron su clasificación. Como ha sido mencionado anteriormente la primera RNR descubierta en el año 1960¹ en *E. coli* fue la RNR de clase Ia, siendo esta el prototipo de enzima para esta clase.

Posteriormente, la RNR de clase II fue descubierta en 1964 en *Lactobacillus leichmannii*⁷ y, finalmente, la RNR de clase III fue descubierta en 1989 en *E. coli* en condiciones de anaerobiosis estricta esencial para poder detectar su actividad enzimática^{8,9}.

1.1.2 Regulación alostérica

Una de las características principales de las RNR es la regulación alostérica que presentan. Las RNR interaccionan con efectores positivos o negativos y presentan centros de unión a estos topológicamente diferentes del centro activo en la subunidad catalítica de la enzima. Las RNR utilizan cuatro sustratos diferentes que se han de reducir en un único centro activo, correspondientes a las cuatro bases de las que está constituida la molécula de ADN, y que por lo tanto implica una regulación alostérica compleja para una reducción equilibrada de los diferentes sustratos en la célula¹⁰⁻¹². Las moléculas efectoras mencionadas anteriormente son capaces de provocar un cambio conformacional en la RNR una vez se unen a los sitios de regulación alostérica y así son capaces de modificar la actividad de las RNR¹³. Además, los sitios de regulación alostérica regulan tanto la especificidad del sustrato o ribonucleótido a reducir y su actividad enzimática global. A continuación, se exponen sus características (Figura 2).

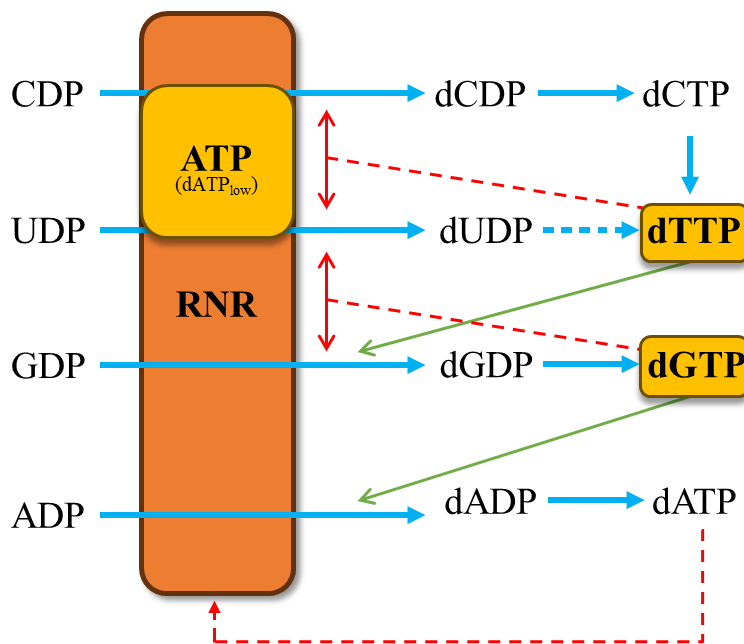


Figura 2: Esquema general para la regulación alostérica de la RNR de clase Ia. Se muestra la reducción de los NDP a sus correspondientes NTPs gracias a la acción de

las moléculas efectoras enmarcadas en el cuadro amarillo (ATP/dTTP/dGTP). Las flechas verdes corresponden a la estimulación de las reacciones por parte de las moléculas efectoras; mediante las flechas en rojo se indican aquellas reacciones que se ven reprimidas. Figura adaptada de⁶.

La especificidad del sustrato:

Esta especificidad del sustrato viene dada por el sitio alostérico de especificidad que se puede localizar en la estructura de la propia RNR (sitio S) y el mecanismo molecular por el cual se da esta acción es muy similar entre las diferentes clases de las RNR^{13,14}, todo y que fue estudiada inicialmente con gran detalle en la RNR de clase Ia¹³⁻¹⁵. Las moléculas efectoras que provocan inicialmente un cambio estructural son los propios nucleótidos de ATP/dATP, dCTP, dGTP y dTTP. En cualquier caso, la unión de estos nucleótidos (efectores) al sitio-S, ubicado en la interfase homodimérica en la subunidad catalítica de la enzima^{13,15}, y la unión de la molécula sustrato provocarán el cambio conformacional en la enzima para que el centro activo de la RNR sea capaz de efectuar la reducción específica de un nucleótido sustrato específico en el centro activo. En el caso de la unión del ATP/dATP se provoca la reducción del CDP/CTP y del UDP/UTP; cuando se une el dGTP la reducción es producida en el ADP/ATP y, finalmente, cuando se une el dTTP, se reduce el GDP/GTP^{6,13}. Con esta regulación se puede controlar los niveles equilibrados de todos los dNTP producidos y su reserva dentro de la célula^{13,14}.

La actividad global de la enzima:

Este segundo tipo de regulación alostérica viene también determinado por un sitio alostérico (sitio A) que, mediante la unión de moléculas efectoras (dATP o ATP) modifican la actividad global de la RNR¹⁶. Tal y como se ha mencionado anteriormente, la regulación alostérica por sustrato se encuentra en todas las clases de las RNR, pero en esta se ha visto que la presencia del sitio A en la RNR de clase III (76%), seguida de la RNR de clase I (47%) y finalmente en muy pocas RNR de clase II (7%)¹⁷. La localización del sitio A en las RNR es próxima al extremo N-terminal de la proteína en una estructura denominada como cono-ATP¹⁸. La unión de la molécula efectora (ATP o dATP) provoca un cambio conformacional en la estructura de la proteína modificando así en la estructura cuaternaria de esta. Esta modificación condiciona a la RNR en tanto en cuanto a su actividad global (de ahí el nombre de esta regulación)^{19,20}. La unión de las moléculas efectoras ATP o dATP provoca efectos completamente opuestos en la RNR, siendo el de aumento de la actividad enzimática cuando el ATP se encuentra unido, mientras que en el caso del dATP provoca una disminución general de la actividad enzimática detectando niveles

altos de los cuatro dNTPs formados²¹. Aquí los niveles globales de dNTPS también se encuentran en equilibrio y se logra gracias a que el bloqueo por parte del dATP es menor debido a una menor afinidad por el sitio S respecto al ATP¹⁹, evitando así el bloqueo completo de la enzima por estas moléculas efectoras¹⁹.

1.1.3 Mecanismos catalíticos de las ribonucleotidil reductasas.

El mecanismo general de acción de estas enzimas se puede explicar mediante procesos concatenados representados en la Figura 3. El primero de ellos se basa en la generación de un radical en la RNR gracias a la participación de un cofactor metálico (ver apartados posteriores). En este proceso el radical proteico generado es transferido a la propia enzima mediante una cadena transportadora de electrones y para finalmente generar un radical tiólo en una cisteína, de esta manera formándose un radical cisteinilo ($S^\bullet$) presente en el centro activo de la enzima. Posteriormente, el radical cisteinilo oxida el hidroxilo del carbono 3' de la ribosa del ribonucleótido generándose su reducción. Esta reducción se produce mediante la captación de un hidrógeno de la cisteína más próxima al ribonucleótido que es transferido al carbono 2'. En el siguiente paso se reduce el carbono 3' gracias a la captación del hidrógeno proveniente de una cisteína más distal, generando así un puente disulfuro entre las dos cisteínas. Finalmente se reestablece el estado reducido del centro activo mediante la donación de un nuevo electrón.

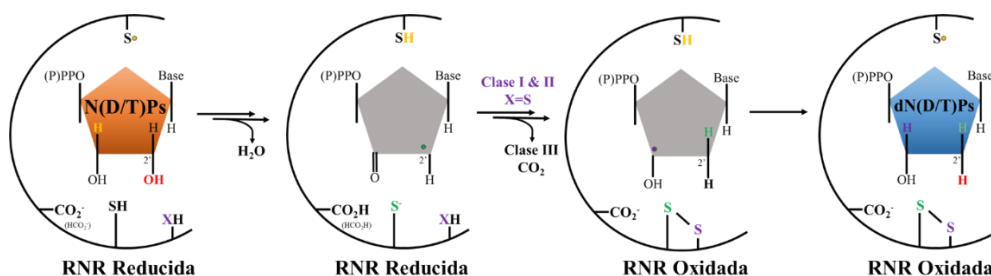


Figura 3: Esquema simplificado del mecanismo de acción de las RNR. Figura adaptada de²².

Los donadores de electrones más frecuentes son las tiorredoxinas y las glutarredoxinas. Estos son reductasas dependientes de un grupo tiol. En el caso de las tiorredoxinas, la subsecuente reducción es mediada por la tiorredoxina reductasa donde también se reduce el NADPH (Figura 4) y, las glutarredoxinas utilizan la

glutación reductasa mediante la reducción del glutatión usando NADPH (Figura 4)^{6,10,23,24}.

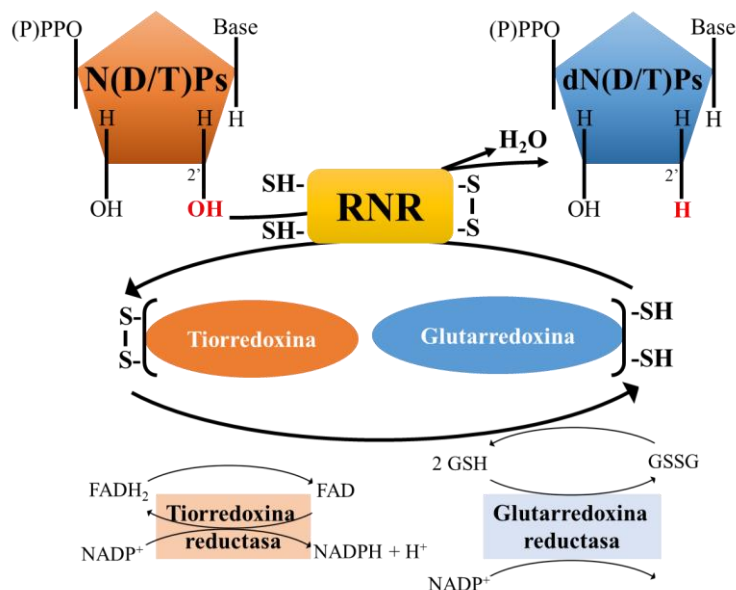


Figura 4: Mecanismo de reducción de las cisteínas del centro activo de las RNR mediante las tiorredoxinas y las glutarredoxinas. Figura adaptada de²⁵.

1.2 Las RNR de clase I

La RNR de clase I es la más conocida de las tres. Esta clase se encuentra tanto en organismos procariotas, Archeas y Eubacterias, como en Eucariotas. También se han identificado en diferentes virus y bacteriófagos⁶.

Esta clase de RNR es dependiente de la presencia de oxígeno para que sea activa, ya que es necesario para oxidar su cofactor metálico presente en la subunidad activadora (Figura 5). Su estructura se basa en dos subunidades homodiméricas: la subunidad catalítica α (grande) que presenta el sitio activo para la reducción de los NDP y en la que se encuentran los centros de regulación alostérica que determinan la especificidad y la actividad enzimática y, la subunidad activadora β (pequeña) en la que se encuentra el cofactor metálico necesario para la generación del radical proteico necesario para la reducción de los ribonucleótidos. Estas dos subunidades pueden dar lugar a diferentes estructuras cuaternarias de la enzima la $\alpha_2\beta_2$ y la $\alpha_6\beta_6$ siendo predominante la primera de ellas^{10,26-28}. El funcionamiento de la ribonucleotidil reductasa se basa en la generación de un radical (generalmente en una tirosina) de la

subunidad activadora β y, que, a través de una cadena transportadora de electrones, se transfiere al centro activo de la proteína activadora donde se genera un radical tiol entre dos cisteínas de la subunidad α . Con esto se inicia el proceso de generación del radical necesario para reducir el ribonucleótido en el centro activo.

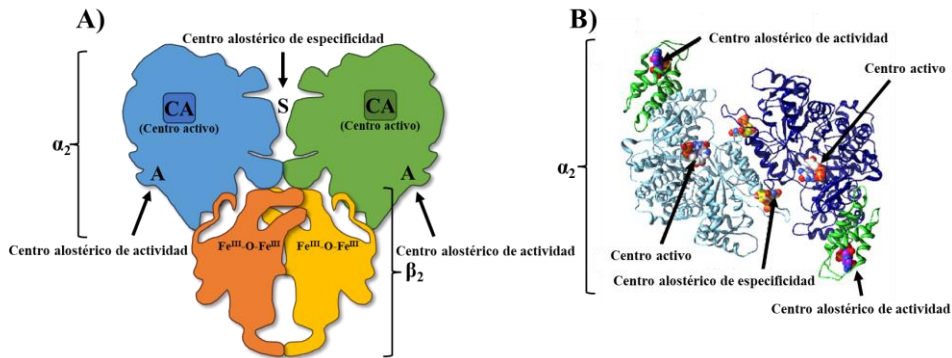


Figura 5: Estructura de la RNR de clase Ia de *E. coli*. Representación de la estructura $\alpha_2\beta_2$ en forma esquemática (A) y tridimensional (B). El centro alostérico de especificidad se indica con una S, el centro alostérico de actividad se indica con una A, el centro activo (CA) se indica en recuadros azul y verde respectivamente, el centro metálico de la subunidad β con Fe^{III}-O-Fe^{III}. Figura adaptada de^{29,30}.

En la actualidad han sido descritos cinco genes homólogos para esta clase de RNR correspondientes a las subclases de RNR de clase I: Ia, Ib, Ic, Id y Ie. Estas subclases difieren en la presencia o ausencia de sitios alostéricos para su regulación, el cofactor metálico que utilizan para generar el radical y el aminoácido aceptor del radical necesario para la reducción de los ribonucleótidos^{23,31-33}. Todas las subclases presentan, en la subunidad β , un centro di-metálico a excepción de la subclase Ie³⁴.

A continuación, se detalla las características principales de cada subclase de RNR:

Subclase Ia: Fue la primera subclase descubierta (1960) y también la primera en hacerlo en el organismo *E. coli*³⁵. Esta clase está codificada por los genes *nrdA* y *nrdB* que codifican para las subunidades α y β respectivamente. El centro metálico responsable de su activación es el centro diférrico (Fe^{III}-O-Fe^{III}) localizado en la subunidad β y que es capaz de generar el radical tirosilo. En la subunidad catalítica (α) se encuentra el centro de regulación alostérica de especificidad y el de actividad global de la RNR^{23,27}.

Subclase Ib: Esta subclase fue descubierta en *Salmonella typhimurium* en el año 1994³⁶. Los genes que la forman se encuentran codificados en el operón *nrdHIEF*.

Este operón da lugar a las subunidades α (*nrdE*) y β (*nrdF*), pero también codifica para una proteína análoga a la glutarredoxina (*nrdH*) y a una flavodoxina específica del sistema (*nrdI*) necesarias para la síntesis y el mantenimiento del centro metálico de la subunidad β (NrdF)^{23,26,37}. El centro metálico, presente en esta subclase en la proteína NrdF, es el mismo que presenta la subclase Ia, pero su forma mayoritaria sustituye los hierros por manganeso (Mn^{II}/Mn^{II})³⁸⁻⁴⁰. En esta subclase la regulación alostérica sólo se produce por especificidad^{6,22}, ya que esta absente los aminoácidos que forman el centro de actividad alostérica general del enzima.

Subclase Ic: La subclase Ic fue descubierta el año 2004 en *Chlamydia trachomatis*. La estructura de esta es muy parecida a la subclase Ia, pero el centro metálico está formado por la estructura que combina el magnesio con el hierro ($Mn^{IV}-O-Fe^{III}$). Este centro metálico se encarga de generar un radical en una fenilalanina (las clases Ia y Ib lo hacían en una tirosina^{41,42}). La subunidad α presenta un mayor tamaño y peso molecular debido a que en el centro alostérico de la actividad general del enzima presenta una duplicación⁴³.

Subclase Id: Esta subclase es la penúltima en descubrirse (2018 en *Flavobacterium johnsoniae* y 2019 en *Actinobacillus ureae*)^{31,32} y todo y su estructura pareciéndose mucho a la subclase Ia (presenta los genes *nrdA* y *nrdB*) presenta el centro metálico Mn^{II}/Mn^{II} (tal y como lo hace la clase Ib) que es oxidado por el anión superóxido o O_2^{2-} ³².

Subclase Ie: Por último, esta clase análoga a la suclase clase Ib (presenta los genes en operón de *nrdHIEF*)^{33,34,44,45}, fue descubierta en 2018 en bacterias como *Streptococcus pyogenes* y *Aerococcus urinae*^{33,34,44}. La ausencia de metales necesarios para la formación de un radical en la subunidad β la diferencia del resto de subclases. Esta función la realiza el O_2 que puede oxidar una tirosina que presenta una modificación postraducciona. Esta característica permite que las bacterias que presentan esta subclase sean capaces de realizar un proceso de infección de una manera más eficaz^{33,34,44}.

1.3 Las RNR de clase II

La RNR de clase II se caracterizó por primera vez, en *Lactobacillus leichmannii*, pero no sólo se encuentra en bacterias, sino que también ha sido aislada en arqueas, eucariotas e incluso en virus y bacteriófagos^{7,46,47}. Esta clase de RNR es enzimáticamente activa en condiciones aerobias como de microaerofilia o anaerobiosis, por lo que la hace independiente de la presencia de oxígeno (opuesto a la clase I). Su estructura se basa en un único polipéptido que corresponde a la subunidad catalítica α (NrdJ) muy parecida a la subunidad análoga de la clase I (subunidad α) y codificada en el gen *nrdJ*. Se ha observado en algunos

microorganismos que la única unidad transcripcional *nrdJ* está dividida y formada por dos unidades transcripcionales (*nrdJa* y *nrdJb*), que forman parte del mismo operón, como en el caso de *P. aeruginosa*^{48,49}. NrdJ, es la subunidad catalítica encargada de reducir los NDP/NTP a dNDP/dNTP, pero necesita de la presencia del cofactor S-adenosilcobalamina (AdoCbl o vitamina B₁₂) para la generación del radical y desempeñar su función enzimática^{6,22}. La subunidad α puede estar agrupada formando una estructura cuaternaria mediante monómeros (α como en *L. leichmannii*) o bien en forma de dímeros (α_2 como en *Thermotoga maritima*^{7,50}) (ver Figura 6).

En la RNR de clase II el mecanismo de actividad catalítica de la enzima es muy similar a la RNR de clase I, compartiendo el sistema redox de cisteínas del centro activo como también la regeneración del sitio activo mediante tioredoxinas y glutarredoxinas^{28,51} (Figura 3). La diferencia con las RNR de clase I se basa principalmente en la generación del radical, ya que se realiza por la interacción directa entre el sitio activo y la AdoCbl^{22,28}. El cobalto de esta vitamina modificada sirve de centro metálico para la generación del radical 5'-desoxyadenosilo necesario para reducir la cisteína que genera el radical tílo⁵² en el centro activo del enzima, necesario para formar un puente disulfuro que ayudará a reducir el ribonucleótido que sirve como sustrato⁵³.

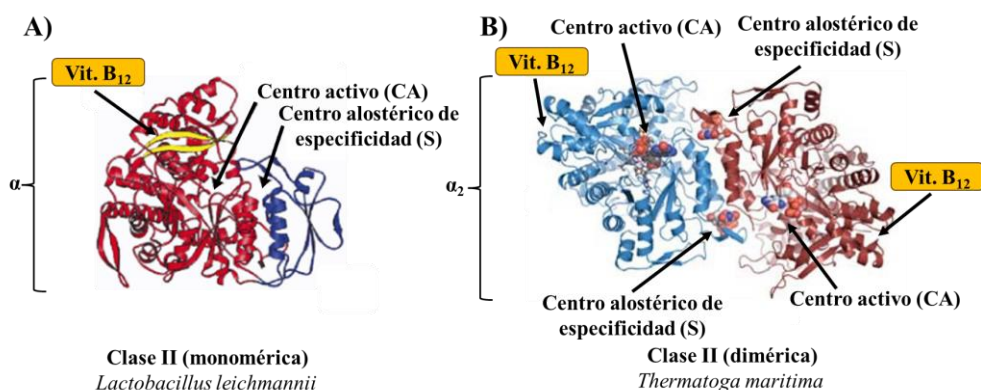


Figura 6: Estructura de la RNR de clase II de *Lactobacillus leichmannii* y *Thermotoga maritima*. Representación de la estructura α en forma tridimensional (A) y α_2 tridimensional (B). Se muestran el centro alostérico de especificidad (S), el centro activo (CA) y el sitio de unión de la vitamina B₁₂ en un recuadro amarillo. Figura adaptada de^{50,54}.

De forma generalizada esta clase posee sólo sitios de regulación alostéricos de especificidad²⁸, pero en organismos como *Thermoplasma acidophilum* poseen también centro de regulación alostérica de la actividad⁴⁹.

1.4 Las RNR de clase III

La RNR de clase III fue la última en descubrirse en 1989, gracias a que se utilizaron condiciones de anaerobiosis estrictas en un cultivo de *E. coli*^{8,55}. Todo y esto, la RNR de clase III no sólo se encuentra en este organismo, también ha sido hallada en arqueas, en eubacterias y bacteriófagos^{8,56-59}.

Al contrario de las dos clases de RNR anteriores (I y II), esta presenta susceptibilidad extrema al oxígeno, por lo que en condiciones donde haya oxígeno o microaerofilia no podrá realizar su actividad enzimática ya que el centro metálico presente en la enzima se ve oxidado y se hidroliza el enlace peptídico a nivel del radical proteico generado⁶⁰. Además, al igual que en la RNR de clase II, necesita de un cofactor externo para generar su radical proteico, en este caso la S-adenosilmetionina o SAM^{6,22,55}. Su estructura proteica cuaternaria (ver Figura 7) consta de dos subunidades: catalítica/ α y activasa/ β . Ambas subunidades se encuentran codificadas dentro del operón *nrdDG*, siendo la subunidad catalítica la correspondiente al gen *nrdD* (NrdD), mientras que a la activasa está codificada en el gen *nrdG* (NrdG). En NrdD se encuentra el centro activo del enzima y los centros de regulación alostérica, tanto de especificidad como de actividad⁶. Además, esta proteína se agrupa formando estructuras α_2 , pero esta no será activa a menos que la subunidad β o activasa forme el homodímero correspondiente β_2 y se una formando la estructura $\alpha_2 + \beta_2$ ⁶¹ para tener una estructura enzimáticamente activa. En esta RNR el centro metálico en NrdG, está formado por la estructura que combina el hierro con el azufre en un clúster de (4Fe-4S) que en condiciones reducidas es capaz de hidrolizar SAM y de esta manera poder generar el radical necesario para iniciar la reducción de los ribonucleótidos (5'-desoxyadenosil). Este radical es transferido a la subunidad α o catalítica donde, en una glicina, se formará el radical glicilo que presenta sensibilidad al oxígeno tal y como lo hace también el centro metálico anteriormente mencionado dentro de la subunidad β o activasa^{5,28,60,62,63}.

A partir de este radical glicilo formado se transfiere el radical a una cisteína de la subunidad catalítica de la enzima donde se forma el radical tiilo necesario para la reducción final de los ribonucleótidos⁶⁰. La recuperación del estado redox original se realiza mediante el formato, contrariamente a lo que sucede con las RNR de clases I y II donde se producía por el sistema de glutarredoxinas y tiorredoxinas^{60,64}.

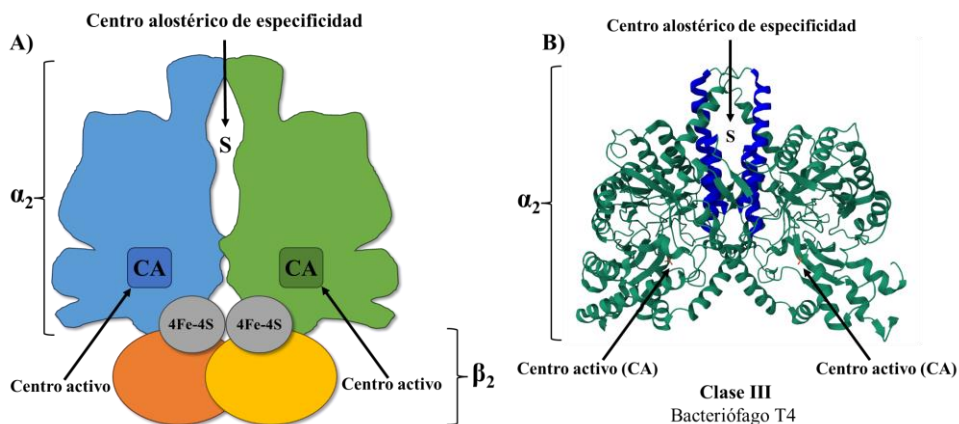


Figura 7: Estructura de la RNR de clase III del bacteriófago T4. Representación de la estructura de la RNR de clase III en forma esquemática (A) y tridimensional (B). Se indican el centro alostérico de especificidad (S), el centro activo (CA) y el centro metálico de la subunidad β (4Fe-4S) en círculos de color gris. Figura adaptada de^{15,54}.

1.5 Distribución de las RNR y significado ecológico

Como se ha mencionado anteriormente, las RNR pueden ser activas en diferentes condiciones ambientales, ya sea por la disponibilidad de oxígeno (aerobiosis, microaerofilia y anaerobiosis), presencia o ausencia de ciertos componentes como metales (hierro o manganeso), o cofactores necesarios para su actividad (S-adenosilcobalamina, S-adenosilmetionina, formato, etc) presentes en un medio o nicho ecológico determinado. Esto ha conllevado que ciertos organismos pueden adaptarse a múltiples nichos. En estos nichos, las condiciones pueden variar en un tiempo razonablemente pequeño, pudiendo desplazar a los colonizadores primarios más abundantes y dominantes. Una vez sucede esto último, pueden formarse estructuras más complejas, debido al aumento en el número total de especies en un determinado nicho ecológico.

Tal es la importancia de las RNR en los organismos vivos que sin este enzima esencial no pueden sobrevivir en estos nichos ecológicos (Figura 8).

Pero ¿Cuáles son las RNR o la distribución de estas más habituales en cada dominio? Si nos centramos primeramente en los organismos eucariotas complejos, estos presentan casi siempre la RNR de clase I^{6,22,28} y, por tanto, son dependientes completamente de condiciones de crecimiento aeróbicos. En eucariotas más simples o unicelulares se ha podido identificar también la RNR de clase II (Ejemplo: la microalga *Euglena gracilis*⁴⁶) o de clase III (Ejemplo: el hongo *Gibberella zeae*)^{6,22}.

Las eubacterias, son los organismos que pueden llegar a codificar para todas las clases de RNR descubiertas hasta el momento (clase I, II y III) incluyendo las diferentes subclases de la RNR de clase I^{6,27,31,45,57,60,65-72}. En el caso del dominio de las arqueas, capaces de sobrevivir en ambientes mucho más primitivos que las eubacterias, presentan principalmente las RNRs de clase II^{7,46,47} y III^{8,56-59}, pero también se ha visto que algunas de ellas presentan algún subtipo de RNR de clase I.

Es importante tener en cuenta que la presencia de una clase u otra de RNR puede determinar que una bacteria pueda poder crecer en un nicho ecológico determinado (Figura 8). En ambientes más extremos para la vida tal y comúnmente tenemos pensada, los anaerobios facultativos y anaerobios estrictos codifican para la RNR de clase II y III.

La facultad de presentar múltiples RNR codificadas en el genoma de los diferentes organismos, provoca que no siempre se pueda determinar con exactitud la presencia de estas RNR con el hecho de encontrar un organismo bajo ciertas condiciones o de corresponder a un mismo grupo filogenético^{5,47}. Un caso conocido es el de *Streptomyces coelicolor* el cual presenta RNRs de clase Ia y clase II. Este organismo es considerado un aerobio obligado, pero se piensa que la presencia de la RNR de clase II se utiliza en momentos en los que las condiciones de oxígeno corresponden más con las que se podría esperar de un anaerobio facultativo o microerofilia⁷³.

Hasta el momento, se han identificado principalmente RNR virales en bacteriófagos, aunque también se han observado en virus como el herpes simplex (HSV) o el virus de la varicela zoster (VZV)^{74,75}. Además, se ha constatado que los virus pueden tener codificadas en su genoma las tres clases de ribonucleótido reductasas. La más prevalente es la RNR de clase I, seguida por la RNR de clase II y, en menor medida, la RNR de clase III⁷⁴⁻⁷⁸.

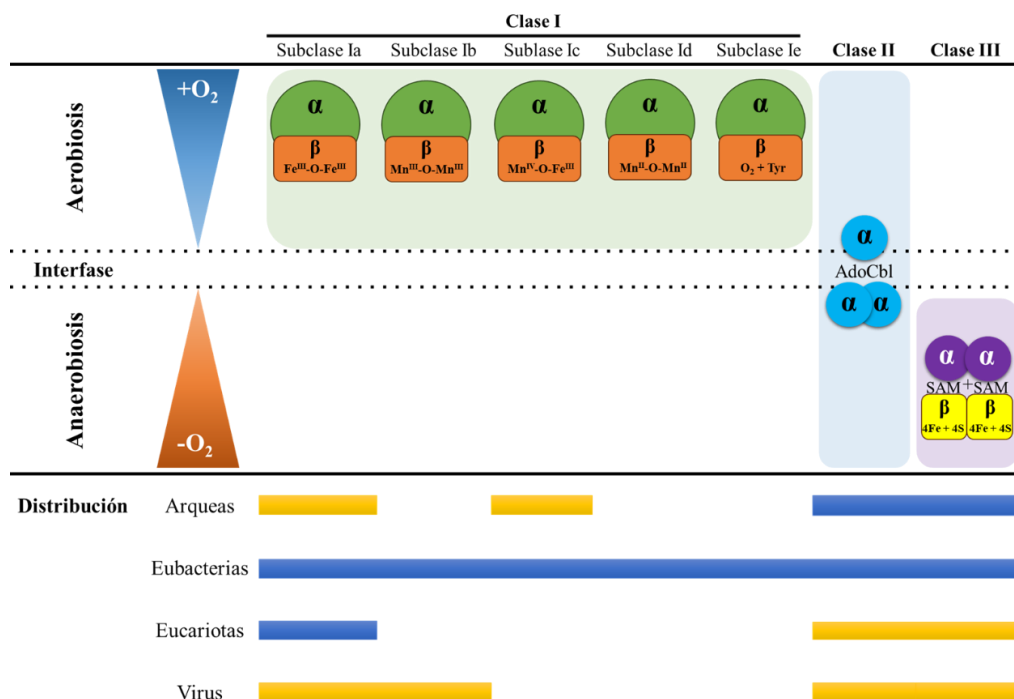


Figura 8: Distribución de las RNR dependiendo de su actividad bajo diferentes condiciones de oxígeno y en función de la concurrencia en organismos. Las cajas en verde, azul y morado representan la actividad de la RNR en función de la presencia o ausencia de oxígeno. Las barras en azul representan las ocurrencias más altas, mientras que en amarillo las ocurrencias más bajas. Figura adaptada de⁶.

1.6 Las RNRs de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*

Los dos microorganismos principales estudiados en el trabajo de investigación llevado a cabo durante esta tesis son *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Escherichia coli* K12 MG1655. Ambas codifican para diferentes clases de RNR en su genoma lo que les permite sobrevivir a diferentes condiciones ambientales. A continuación, expondré algunas de las peculiaridades que tienen estos microorganismos respecto a las RNR codificadas en sus genomas.

E. coli, presenta codificadas en su genoma para tres clases de RNR, dos de clase I, la subclase Ia (*nrdAB*) y la subclase Ib (*nrdHIEF*) y la RNR de clase III (*nrdDG*). Como ha sido mencionado con anterioridad, las RNR de clase I son plenamente funcionales en condiciones aerobias^{37,79}. Se ha visto que el papel que desarrolla la subclase Ib se encuentra parcialmente solapado con el que ejerce la

subclase Ia, exceptuando casos donde el hierro no es un factor limitante. Esto es debido a que la subclase Ib no requiere del ion hierro en su centro metálico, ya que la clase Ib utiliza el manganeso como metal sustitutorio del hierro. No obstante, se ha visto que presentar una RNR de subclase Ib facilita la supervivencia de la bacteria en varias condiciones ambientales como: crecimiento con bajo niveles de hierro durante el proceso de infección⁸⁰, formación de biofilm⁸¹, condiciones con limitación de nutrientes⁸¹ y bajo estrés oxidativo⁸². A pesar de ello, se ha visto que en ausencia de la RNR de clase Ia esta especie no puede mantener el crecimiento, por lo tanto, es esencial durante el crecimiento exponencial de la bacteria. La regulación transcripcional de la clase Ia se lleva a cabo por elementos transcripcionales como DnaA, Fis e IciA^{38,83}, mientras que la clase Ib se encuentra regulada por FUR. La tercera RNR codificada en su genoma es la RNR de clase III, la cual resulta indispensable para esta bacteria cuando se encuentra creciendo bajo condiciones de anaerobiosis estricta^{8,55} y se encuentra regulada por FNR^{84,85}. Los mecanismos moleculares que regulan su transcripción se detallan en el apartado 1.7.

P. aeruginosa es un caso bien particular, ya que es de los pocos organismos en los que han descrito la presencia de las tres clases de RNR codificadas en su genoma: la clase I (subclase Ia), clase II y clase III⁸⁶⁻⁸⁸. Esto hace pensar en que este organismo presenta una alta adaptabilidad a diferentes ambientes y lo que le permite adaptarse a diferentes nichos ecológicos ya que presenta la disponibilidad de diferentes RNR que pueden ser enzimáticamente activas diferencialmente. La RNR de clase Ia se encuentra codificada por los genes *nrdAB* tal y como se ha expuesto con anterioridad, pero presenta ciertas peculiaridades. Esta RNR presenta una secuencia de aminoácidos de un tamaño algo mayor (220 a 230 aminoácidos más grande) que el resto de las RNR de clase Ia presentes en las γ -proteobacterias. Esta extensión de aminoácidos se encuentra principalmente en la parte N-terminar que corresponde a una duplicación en la secuencia responsable de la regulación alostérica de la actividad (o el cono de ATP)⁸⁹. Esta duplicación no provoca que ambos conos de ATP desarrollen la misma función, mientras que uno ejecuta una regulación alostérica, el segundo tiene un papel importante en la estabilización de la estructura cuaternaria de la propia proteína^{89,90}. También presenta otra modificación, en la proteína NrdB, que a consecuencia de ella provoca que el radical generado para la reducción de los ribonucleótidos tenga una vida media muy corta siendo la proteína incapaz de activarse en condiciones anaeróbicas. En condiciones estándar las RNR de clase I necesitan la presencia de oxígeno en su síntesis para ser enzimáticamente activas⁸⁹.

En este microorganismo la RNR de clase II también presenta ciertas particularidades, ya que se encuentra codificada por dos unidades transcripcionales independiente codificada por los genes *nrdJa* y *nrdJb* separados por 16 bp. Estos genes dan lugar a dos proteínas, NrdJa y NrdJb respectivamente, que desarrollan funciones diferenciales. Mientras que NrdJa lleva a cabo la regulación alostérica de

la proteína y contiene también el centro activo, NrdJb lleva a cabo la donación de electrones y alberga el lugar de unión al cofactor de la vitamina B₁₂ (S-adenosilcobalamina)^{48,68,86,88}.

1.7 Regulación de la expresión génica de las ribonucleotidil reductasas

Los microorganismos dependen de los niveles equilibrados de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), fundamentales para la replicación y reparación del material genético. Por ende, el equilibrio de los dNTPs desempeña un papel esencial en el ciclo vital de los organismos y en su capacidad de adaptación en ambientes cambiantes⁶.

Como se mencionó anteriormente, las bacterias y otros organismos tienen la capacidad de codificar en su genoma los genes para la síntesis de las enzimas ribonucleotidil reductasas (RNR). Estas enzimas catalizan la conversión de ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos, proporcionando los bloques de construcción necesarios para la replicación y reparación del ADN.

En las últimas décadas, han sido secuenciados los genomas de muchos organismos. Algunos de ellos presentan más de una clase de ribonucleotidil reductasa en su genoma⁶. Este hecho planteó dos cuestiones, la primera sobre si el equilibrio de dNTPs es vital para los procesos de reparación y síntesis del ADN, y la segunda si era un proceso altamente regulado.

Debido a esto último, un estudio demostró que un desequilibrio en estas moléculas (dNTPs) resulta en una mayor tasa de mutación. Además, concluyeron que esta alteración en la tasa de mutación provoca a una pérdida de precisión en la replicación del ADN^{11,12}.

Por lo tanto, la regulación de estas enzimas que influya tanto a la actividad (regulación alostérica) (ver apartado 1.2) como a la cantidad enzimática (regulación transcripcional) de las RNR, representa un aspecto crítico para mantener los niveles equilibrados de los cuatro desoxirribonucleótidos (dNTPS)^{22,91}.

1.7.1 Regulación transcripcional

La regulación transcripcional desempeña un papel de vital importancia en el control preciso de la cantidad de enzima que se expresa. En el contexto de la regulación de las RNRs, este mecanismo ejerce dos funciones primordiales. En primer lugar, permite ajustar el equilibrio global de la cantidad de RNRs disponible en un momento específico del ciclo celular, especialmente cuando la demanda de

desoxiribonucleótidos (dNTPs) se encuentra en su punto máximo. En segundo lugar, regula cuál de las múltiples enzimas RNR presentes en el genoma de un organismo se está transcribiendo y/o expresando en un determinado momento^{6,22,91}.

La regulación basada en la demanda de dNTPs se lleva a cabo principalmente durante las etapas iniciales de la división celular, un período caracterizado por la replicación activa del ADN. Además, se observa un aumento significativo en la expresión génica de las RNRs en situaciones de estrés oxidativo, como la exposición a radiación ultravioleta u otras condiciones de estrés o en condiciones donde se detiene la replicación del ADN. Esta respuesta adaptativa hace notoria la importancia de las RNRs en el mantenimiento y reparación del material^{6,22,91}. A continuación, se expondrán algunos ejemplos de dicha regulación en procariotas aunque las peculiaridades entre cada especie bacteriana es notable.

La regulación transcripcional en *Escherichia coli*

Como se ha mencionado en el apartado 1.3, *E. coli* presenta tres clases de RNR, dos de clase I (subclase Ia y Ib) y una de clase III. Hasta el momento se ha descrito que la RNR de subclase Ia se encuentra regulada por los factores transcripcionales DnaA, Fis, IciA, CRP, H-NS y NrdR⁹². A continuación, se describirán las principales características de estos y cómo regulan a esta clase de RNR (ver Figura 9).

DnaA es conocida por ser la proteína encargada de la iniciación de la replicación bacteriana. Su expresión se encuentra ligada al ciclo celular bacteriano, siendo esta mayor durante la fase de replicación del ADN y también pudiéndose verse aumentada si se producen daños en el material genético bacteriano, dando lugar a un incremento de la transcripción de las RNR para procesos de reparación del ADN^{91,93-96}. La función de la DnaA se encuentra estrechamente vinculada al nucleótido ATP, ya que es mediante el complejo DnaA-ATP, la presencia de ATP es alta durante un estado celular con alta capacidad energética, la proteína puede unirse a dos cajas presentes en el promotor de la RNR de subclase Ia (cajas en posición -48 pb y -36 pb respecto al inicio de transcripción [TSS])^{91,92,97,98}. Fis es una proteína encargada de promover la replicación por lo que desempeña una función similar a DnaA respecto a la regulación transcripcional de la RNR de subclase Ia encontrándose varios sitios reguladores dentro del promotor^{92,98}. Mientras que DnaA y Fis son activadores transcripcionales y promotores de la replicación bacteriana, la proteína IciA es considerada inhibidora de la replicación bacteriana (antagónica a DnaA)^{94,99}. Por otro lado, la proteína CRP es considerada un sensor de los niveles de AMPc y regula a la RNR subclase Ia mediante su unión a una caja ubicada en la posición -136 pb respecto al TSS⁹⁵. La proteína H-NS es considerado un represor global y su función ha sido correlacionada con genes regulados por las condiciones ambientales⁹⁶. Por último, el

regulador transcripcional NrdR, ver información más detallada en el apartado 2.4 Estructura y función de NrdR, es considerado como un represor global de las diferentes clases de RNR^{83,100–102}.

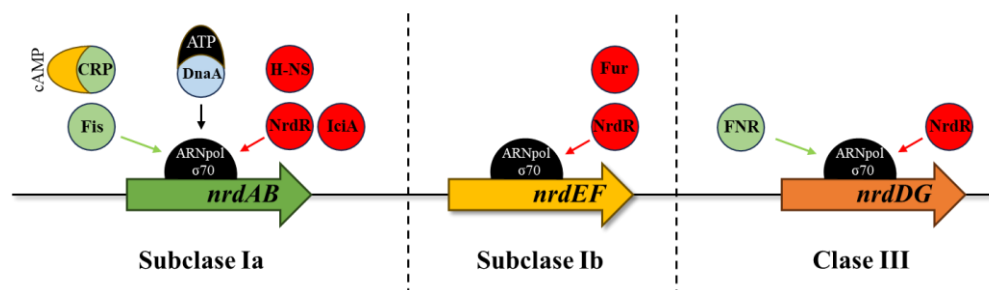


Figura 9: Esquema de la regulación transcripcional de las RNR presentes en *E. coli*. Los activadores transcripcionales se encuentran en verde; los represores transcripcionales se encuentran en rojo y los que pueden activar o reprimir se encuentran en azul.

En la RNR de subclase Ib no se encuentra tan bien caracterizada a nivel de su regulación transcripcional y sólo se sabe que se encuentra regulada por los reguladores transcripcionales Fur y NrdR¹⁰³ (Figura 9). Ambos son considerados represores de esta clase de RNR y se cree que la activación se lleve a cabo por condiciones donde existen condiciones limitantes de hierro y donde existe un alto grado de estrés oxidativo. Esto se ha teorizado debido a que el cofactor metálico presente en esta subclase está formado por di-manganeso (no di-hierro)¹⁰³.

La RNR de clase III codificada en *E. coli* se encuentra regulada por el factor transcripcional Fnr que regula el metabolismo anaeróbico. Fnr se une a los sitios de unión localizadas en las posiciones –65 pb y –35 pb respecto al TSS^{84,85}. Por último, NrdR actúa también como represor de esta clase de RNR uniéndose en las cajas NrdR box específicas⁸³.

La regulación transcripcional de *Pseudomonas aeruginosa*

Tal y como se ha mencionado en anterioridad en el apartado de RNR de *E. coli* y *P. aeruginosa*, este microorganismo presenta las tres clases de RNR codificadas en su genoma. Este hecho la hace ser un caso bien particular en cuanto a la distribución de sus RNR. Concretamente *P. aeruginosa* codifica para las clases Ia, II y II y su expresión se encuentra regulada por varios factores transcripcionales (ver

Figura 10). Por ello, a continuación, se expondrán brevemente aquellos que se conocen hoy en día, así como sus principales características al respecto.

En la RNR de la subclase Ia, se observa regulación por parte de dos factores transcripcionales: AlgR y NrdR (ver detalle en el apartado 2.4 Estructura y función de NrdR). AlgR es un sistema de dos componentes que actúa junto a FimS (AlgR-FimS). En este sistema, FimS se activa en respuesta a condiciones de estrés, lo que a su vez desencadena la fosforilación de AlgR. Esta fosforilación activa AlgR, el cual induce la expresión de genes responsables de la producción de alginato durante la fase estacionaria¹⁰⁴. Es importante destacar que, en su forma fosforilada, AlgR también desempeña un papel crucial en la regulación de la RNR de clase Ia, ya que provoca un incremento en la expresión génica de esta RNR en fase exponencial¹⁰⁵.

En el caso de la RNR de clase II se ha visto que aquellos factores transcripcionales que veíamos en la RNR de clase Ia (AlgR y NrdR) también se encuentran regulando esta clase. Adicionalmente también se ha encontrado su regulación por Anr^{71,106,107}. Este último es considerado un factor transcripcional anaerobio y es bajo estas condiciones donde el oxígeno no se encuentra con la misma facilidad que en el sistema Anr/Dnr. Esta clase de RNR es importante en condiciones de crecimiento anaeróbicas y en la formación del biofilm bacteriano⁷¹.

Por último, la RNR de clase III vemos que hasta el momento los únicos factores transcripcionales identificados hasta el momento que la regulan son NrdR y Anr de igual manera como se ha visto para la clase II⁷². Esta clase se activa exclusivamente bajo condiciones de privación de oxígeno. Particularmente se ha visto que la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 presenta una mutación dentro de su promotor que afecta a las cajas de Anr. Ello conlleva a una menor activación de esta enzima respecto a otras cepas de *P. aeruginosa* que no la presentan⁷².

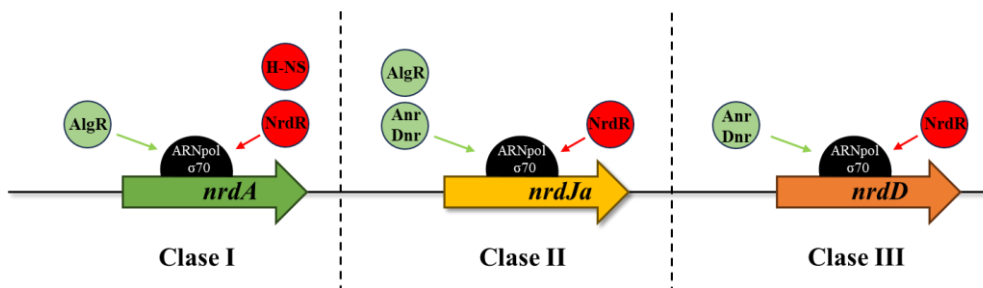


Figura 10: Esquema de la regulación transcripcional de las RNR presentes en *P. aeruginosa*. Los activadores transcripcionales de las diferentes RNR se encuentran en verde; los represores transcripcionales se encuentran en rojo.

1.7.2 Regulación mediada por riboswitch

Se ha podido observar y comprobar experimentalmente que la RNR de la subclase Ia presente en *Streptomyces coelicolor* puede estar regulada por riboswitches, un tipo de regulación a nivel postranscripcional en el que interviene la vitamina B₁₂ en la región 5'UTR del ARNm producido¹⁰⁸. El estudio revela que los riboswitches que dependen de B₁₂ son de vital importancia para regular los genes de las RNR en *Streptomyces* (subclase Ia). El funcionamiento de este viene determinado por la región 5'UTR aguas arriba del gen de la ribonucleotidil reductasa; mientras que el gen en sí no es dependiente de B₁₂ el riboswitch sí lo es y es el balance de B₁₂ intracelular el que regula todo el sistema. En condiciones de ausencia de oxígeno la RNR de clase II se encuentra activa (depende de B₁₂), mientras que la RNR de clase Ia sólo funciona como un potencial sistema de recuperación una vez la clase II se encuentra inactiva (Figura 11A). Un ejemplo de ello sería el caso en que la síntesis de B₁₂ es limitante debido a la privación de cobalto o los precursores de la síntesis de este (Figura 11B)¹⁰⁸. En el caso de *P. aeruginosa* se ha identificado una región UTR en la RNR de clase Ia¹⁰⁵.

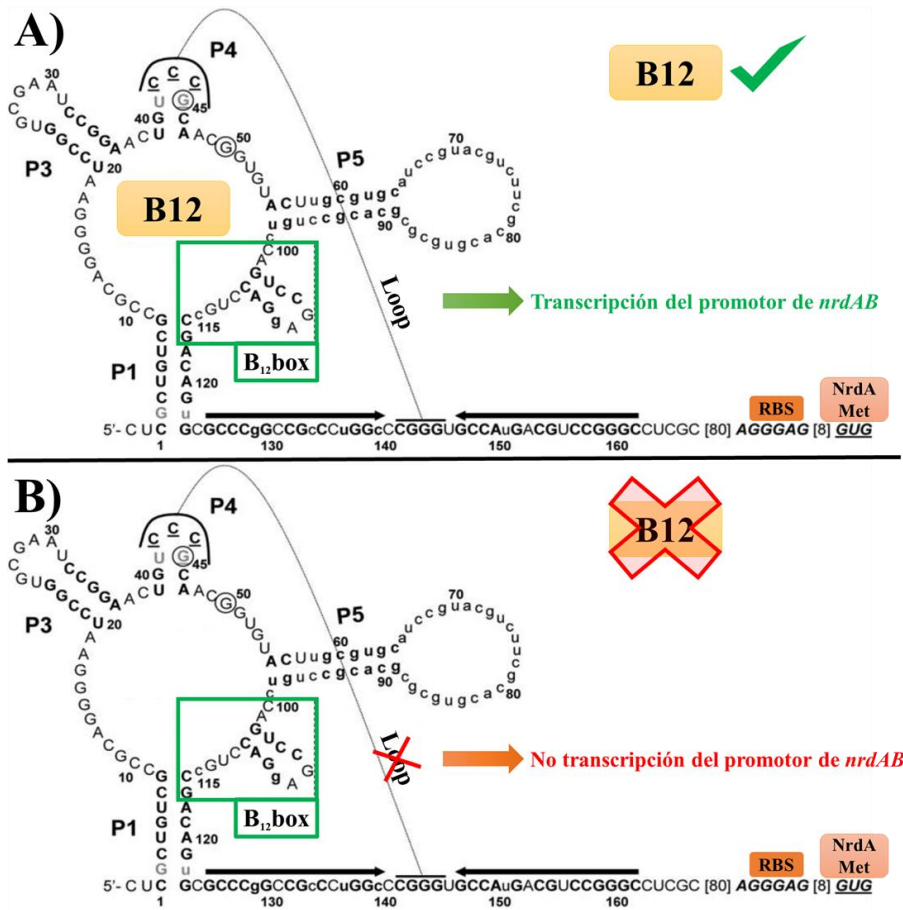


Figura 11: Funcionamiento de la estructura secundaria del ARNm correspondiente al riboswitch de la RNR de clase Ia en *S. coelicolor*. Se representan la caja conservada de unión a la vitamina B₁₂ (B₁₂ box) en un recuadro verde; las diferentes secuencias complementarias del riboswitch (P1, P2, P3, P4 y P5); la secuencia de unión al ribosoma (RBS) y el codón de inicio de la transcripción GUG (NrdA Met). Las dos flechas negras indican regiones hipotéticas correspondientes con terminadores transcripcionales. A) En ausencia de la vitamina B₁₂ se produce un loop entre la región P4 del riboswitch y la secuencia complementaria correspondiente al terminador, esto provoca una desestabilización de la secuencia secundaria del ARNm y de su consiguiente bloqueo transcripcional parcial (o total) del promotor del gen *nrdABS* (clase Ia), permitiendo así la transcripción. B) Cuando hay suficiente B₁₂ disponible, se produce la unión de esta en una región próxima a la región P4 del riboswitch, impidiendo así el loop entre las secuencias de P4 y el terminador transcripcional, inhabilitando así la transcripción. Figura adaptada de¹⁰⁸.

2. El factor transcripcional NrdR

2.1 Aspectos generales del factor transcripcional NrdR

NrdR es un factor transcripcional asociado a la regulación de la reducción de ribonucleótidos en células bacterianas, ya que regula las enzimas ribonucleotidil reductasas (RNR)^{6,87,109}. Se ha observado que esta proteína se encuentra presente en la mayoría de los grupos taxonómicos bacterianos, pero se encuentra ausente en arqueas y en eucariotas.

El factor transcripcional NrdR es un elemento central en esta tesis, por lo tanto, se abordarán los aspectos más relevantes como su descubrimiento, contexto génico, estructura, funciones y regulación de su expresión génica.

2.2 Descubrimiento y contexto de *nrdR* en el genoma bacteriano

El descubrimiento de NrdR ocurrió después del hallazgo de todas las clases de ribonucleotidil reductasas (RNR de clase I, II y III). Inicialmente, fue identificado como un "open reading frame" (ORF) en el año 2002 sin función asignada. Este ORF se ubicaba en la región aguas arriba del gen *nrdJ* en los organismos *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces clavuligerus*⁶⁵. El nombre que se le asignó a este ORF fue el de *orfR*, pero posteriormente se observó y demostró que se encontraba cotranscrito junto al gen *nrdJ* (RNR de clase II). Este suceso desencadenó en el cambio de nombre a *nrdR*, dando lugar al operón conocido como *nrdRJ*¹¹⁰.

El gen *nrdR* fue posteriormente descubierto en otros microorganismos dentro del dominio de las bacterias. Algunos ejemplos de estos organismos incluyen los géneros de: *Bacillus*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Carboxydotherrmus*, *Desulfitobacterium*, *Microbulbifer*, *Escherichia*, *Pseudomonas* etc ¹⁰⁹. En la Figura 12, se presentan las diferentes localizaciones del gen *nrdR* en las especies de estos géneros microbianos. Como se puede observar, *nrdR* puede estar estrechamente relacionado con los genes de las RNR ^{109,110}, mientras que en otros casos puede estar asociado a genes implicados en el metabolismo del propio ADN (*dnaI* y *dnaB*)¹⁰⁹ o bien a genes relacionados con la síntesis de riboflavina (*ribD*)^{109,110}.

Posición asociada a las RNR:

Asociados a *nrdJ*
Actinobacteria

Streptomyces (coelicolor)

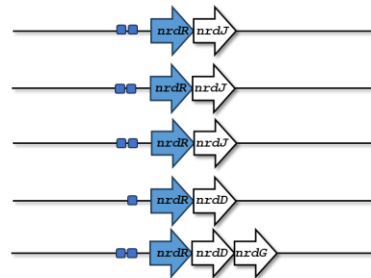
Desulfotobacterium halfniense

Asociados a *nrdD*

Treponema denticola

Carboxydotherrnus hydrogenoformens

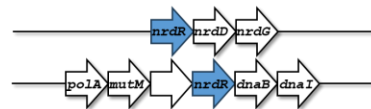
Organización de los operones de *nrdR*



Grampositivas ricas en AT y/o río arriba de genes involucrados con el metabolismo del ADN:

Bacillus y *Streptococcus*

Staphylococcus y *Lactobacillus*



γ -proteobacteria asociados a genes relacionados con la riboflavina:

Proteobacteria

(*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*)

Microbulbifer degradans

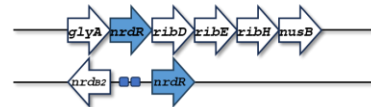


Figura 12: Ejemplos de la organización de los operones que contienen el gen *nrdR* en diferentes microorganismos. El gen *nrdR* se encuentra representado con una flecha de color azul, mientras que los otros genes se representan mediante una flecha de color blanco; las cajas de unión de NrdR se encuentran representadas mediante un recuadro azul. Figura adaptada de¹⁰⁹.

Paralelamente al descubrimiento de *nrdR*, un equipo de investigación identificó el factor de transcripción NrdR y sus elementos de regulación en cis correspondientes mediante predicciones bioinformáticas¹⁰⁹. En este estudio, se analizaron secuencias palindrómicas conservadas previamente identificadas en las regiones promotoras de los operones de las enzimas ribonucleotidil reductasas (RNRs)^{66,111}. Estas secuencias se reconocieron como posibles elementos de regulación en *cis* asociados a un factor de transcripción, lo que motivó la búsqueda de la proteína transreguladora vinculada a ellas (la aún no nombrada NrdR).

Para este propósito, recopilaron un conjunto de genomas que contenían o carecían de estas secuencias palindrómicas conservadas en los promotores de los genes de las RNR. Luego, emplearon técnicas de genética comparativa para establecer una correlación entre la presencia de secuencias consenso repetidas y la existencia o ausencia de clústeres de grupos de proteínas ortólogas o “clusters of orthologous groups of proteins” (COGs)¹¹². Este enfoque les permitió identificar un clúster de proteínas único presente en todos los grupos ortólogos de proteínas. En este clúster proteico encontraron una secuencia palindrómica repetida (más tarde

nombrada caja NrdR) en los operones de los genes de las ribonucleotidil reductasas, mientras que estaba ausente en otros grupos. Al clúster se le nombró COG1327. Otro equipo de investigadores, corroboró su existencia casi simultáneamente^{109,110}.

Finalmente, este ORF fue renombrado como NrdR, y se nombró a las secuencias conservadas correspondientes a la regulación en *cis* de los operones de las RNR como cajas NrdR o NrdR-boxes¹⁰⁹. A través de este estudio y del análisis de datos genómicos, se estableció un vínculo sólido entre las secuencias palindrómicas conservadas en las regiones reguladoras, el factor de transcripción NrdR y la regulación de los operones de las RNRs en diversas especies¹⁰⁹.

Además, en este último estudio también se pudo confirmar que la presencia de NrdR es exclusiva del dominio de las bacterias. Sin embargo, se identificaron ausencias de este factor transcripcional en ciertos grupos taxonómicos específicos, como ϵ -Proteobacteria, Mycoplasmatales y el grupo de *Bacteroidetes/Chlorobi*¹⁰⁹. En el caso de γ -Proteobacteria, la presencia de NrdR no se ha registrado únicamente en especies que son endosimbiontes o parásitos intracelulares obligados¹⁰⁹. Respecto a arqueas y eucariotas, no se ha detectado el gen *nrdR* en su genoma⁶, lo que ha convertido su estudio en un objetivo prioritario para ciertos grupos de investigación, ya que este representa un objetivo importante para el desarrollo de terapias antimicrobianas y entender el mecanismo transcripcional de las RNR.

En la actualidad, el conocimiento sobre la regulación del factor transcripcional NrdR es muy limitado y sigue siendo objeto de estudio e investigación. Hasta el momento, en el grupo de investigación se identificaron dos sitios de unión al factor transcripcional NarL (cajas NarL) en el promotor de *nrdR* de *P. aeruginosa*. Estas cajas están ubicadas cerca del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de NrdR, a -18 y -40 pb¹⁰². Además, se conoce que este factor transcripcional está estrechamente relacionado con el metabolismo del nitrógeno, siendo este crucial para llevar a cabo la respiración anaerobia en organismos como *P. aeruginosa*¹⁰². Finalmente, se especula que pueden existir otros elementos reguladores del gen *nrdR* y, esta tesis dedicará a explorar algunos de ellos.

2.3 Cajas de unión a NrdR

La proteína NrdR, como factor transcripcional, se une a secuencias ubicadas en las regiones promotoras de todas las RNR, como se mencionó anteriormente. Estas secuencias a las que se une se conocen como cajas NrdR o NrdR-boxes¹⁰⁹. Estas cajas se caracterizan por ser secuencias palindrómicas repetidas que constan de una longitud de 16 pb¹⁰⁹. Sorprendentemente, las especies que codifican en su genoma el factor transcripcional NrdR presentan cajas NrdR en todos los operones de las

enzimas ribonucleotidil reductasas (RNRs) que poseen. La única excepción a esto puede encontrarse en *Rhodobacter capsulatus*, el cual sólo presenta cajas de NrdR en uno de los dos operones de las RNRs que se encuentran en su genoma¹⁰⁹.

Las secuencias palindrómicas de las cajas NrdR pueden expresarse en forma de secuencia consenso: acaCwAtATaTwGtgt. Esta secuencia consenso no es igual para todos los microorganismos que la poseen, pueden encontrarse pequeñas variaciones, principalmente dependiendo del grupo taxonómico al que pertenecen¹⁰⁹. Un estudio previo observó que las cajas de unión al factor transcripcional NrdR suele estar en tándem, mientras que en 27 de los operones regulados por NrdR sólo se observan una sola caja NrdR¹⁰⁹.

La interacción de la proteína NrdR con sus respectivas cajas no es aleatoria, ya que se observó que esta distancia coincide con los giros presentes en la hélice β -ADN, siendo estas de: 21 pb, 31 a 32 pb y 41 a 42 pb cuando hay 2, 3 y 4 giros de esta estructura, respectivamente^{6,70}. En cuanto a la localización de las cajas NrdR en los promotores de las cajas de las diferentes clases de RNR, se encontró que estas estaban presentes en varios microorganismos¹⁰⁹. Además, las cajas NrdR tenían una gran relevancia, ya que estas siempre se sobreponían a la secuencia consenso del promotor basal. Esto sugirió que NrdR pudiera estar regulando, mediante represión, las diferentes clases de RNR que provocan un descenso en la expresión génica de estas^{6,70,83,109,110}.

2.4 Estructura y función de NrdR

NrdR es un factor transcripcional proteico que consta de 140 a 200 aminoácidos⁸⁷. Aunque su estructura y función no siempre han estado claras, la proteína NrdR de *S. coelicolor* es la que hoy en día se encuentra mejor caracterizada^{70,100,110,113}. Recientemente, se han realizado estudios que combinan técnicas bioquímicas y estructurales para entender el papel de los efectores de NrdR necesarios para su unión en el ADN bacteriano¹⁰⁰. Además, también se ha visto el efecto que tienen los diferentes nucleótidos, una vez unidos a NrdR, en relación con la resolución de la estructura necesaria para su función reguladora¹⁰⁰. Por tanto, esta proteína será en la que se basará esta tesis a la hora de explicar tanto su estructura como la función de desempeña.

En lo que respecta a la estructura terciaria de la proteína NrdR, se ha determinado que presenta una estructura tridimensional compuesta por dos dominios principales: el dominio dedo de Zn en el extremo N-terminal y un dominio con un cono de ATP en el extremo C-terminal, tal y como se puede observar en la Figura 13. Ocasionalmente, se ha observado que puede haber un dominio adicional en el extremo C-terminal, conformado por una cola ácida de pequeño tamaño^{6,100,110,114}.

El dominio dedo de Zn es el responsable de la unión al ADN bacteriano y tiene una longitud de 43 aminoácidos¹⁰⁰. Este dominio se encuentra ubicado en el extremo N-terminal de la proteína, como se mencionó anteriormente. La estructura de dedo de Zn es atípica y se conoce como “*rubredoxin-like Zn-ribbon module*”^{70,110}. Esta estructura se caracteriza por la unión entre el átomo de Zn y cuatro residuos de cisteína, formando dos motivos. Estos motivos se encuentran altamente conservados entre todas las secuencias del gen *nrdR*, CxxC¹⁰⁰. La función de estos motivos es permitir la unión entre el factor transcripcional (NrdR) y las cajas NrdR. Además de estos residuos de cisteína, se observó que un motivo de arginina también participa en la unión al ADN¹¹⁵.

El dominio con cono de ATP se encarga de la unión a nucleótidos. Aunque desempeña un papel con los nucleótidos similar a las enzimas que regula, como las que se encuentran en las ribonucleotidil reductasas (RNR) de clase I y clase II^{70,116}, su estructura no es idéntica. Este dominio se caracteriza por estar formado por un haz de cuatro hélices envuelto por una lámina mixta de tres hebras que, a su vez, presentan seis aminoácidos conservados (Val48, Val63, Lys50, Arg51, Lys62 y Thr95)^{70,116}. A diferencia de los dominios con cono de ATP de las RNR, que permiten la interacción proteína-proteína y afectan al estado de oligomerización activo/inactivo de las diferentes clases de RNR^{90,117–123}, el dominio de NrdR presenta dos sitios de unión a nucleótidos, donde puede unirse simultáneamente tanto dATP como ATP¹⁰⁰ de forma simultánea. Recientemente, también se ha descubierto una función adicional de este dominio implicada con la unión al ADN bacteriano¹⁰⁰.

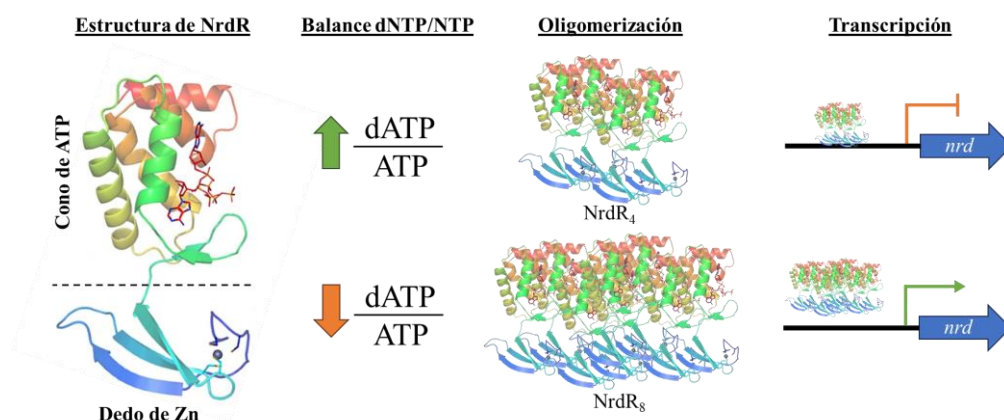


Figura 13: Hipótesis sobre el mecanismo de acción de NrdR. Según el balance intracelular de nucleótidos y deoxinucleótidos presentes, NrdR puede oligomerizar de dos formas posibles. La primera, NrdR₄, ocurre cuando los niveles de dATP son altos, lo que conduce a la represión de la transcripción de los genes de las

ribonucleotidil reductasas (*nrd*). La segunda forma, NrdR₈, se produce cuando los niveles de ATP son altos y NrdR no se puede unir a sus respectivas cajas para provocar la represión de los genes de las reductasas. Figura adaptada de¹⁰⁰.

Esta función se basa en la oligomerización de NrdR, mediada por el cono de ATP¹⁰⁰ (ver Figura 13). Se sugiere que la forma activa de este factor transcripcional se encuentra formando octaedros (NrdR₈), que a su vez generan tetraedros (NrdR₄) capaces de efectuar la represión de las RNR. En la conformación de octaedro, las moléculas de dATP y ATP se unen a cada monómero. Posteriormente, se genera la forma tetraédrica, la cual se une al ADN de los promotores de las diferentes clases de RNR (clase I, clase II y clase III), reprimiendo así su expresión. Cuando la cantidad de dATP disminuye, se forma un dodecaedro en el que sólo tiene unido ATP en los dos sitios de unión a nucleótidos. Esta forma dedecaédrica no permite la unión de NrdR al ADN, y gracias a este equilibrio entre dNTP y NTP se regula la transcripción de las RNR mediante un mecanismo alostérico¹⁰⁰.

3. *Pseudomonas aeruginosa*

3.1 Descripción general

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria heterotrófica, Gram-negativa, con forma de bacilo de 1 a 5 µm de largo por 0,5 a 1 µm de ancho y que presenta motilidad unipolar¹²⁴. Se considera una bacteria aerobia, pero puede crecer en condiciones de anaerobiosis respirando nitrato como aceptor de electrones con una capacidad de fermentación limitada¹²⁴. Su óptimo de crecimiento está en 37 °C, todo y que puede hacerlo también en un rango de entre 4 y 42 °C. Estas características le han permitido habitar diferentes nichos, como aguas estancadas o alimentos que se encuentran en una nevera, por ejemplo. Las principales cepas de laboratorio son PAO1 (cepa de referencia) y PA14. La cepa de referencia presenta un genoma bastante grande (6,3 Mpb) con potencialmente 5.570 genes predichos. Además, presenta una gran variabilidad genética, gracias a su alta capacidad de mutar, por lo que en la actualidad se debería estar hablando más bien de su pangenoma, el cual permite apreciar la magnitud de dicha variabilidad genómica al mostrarnos que sólo el 62 % del total del genoma es compartido por la especie¹²⁵. En cultivos *in vitro*, se puede identificar con facilidad debido a que presenta un color verdoso-azul. Esto es debido a su capacidad para secretar pigmentos como la pioverdina y la piocianina.

La relevancia de *P. aeruginosa* es tanto ambiental como clínica. Esta ha ido aumentando con los años debido a su implicación directa en fenómenos de

biorremediación, así como su papel en enfermedades infecciosas de gran relevancia en la actualidad que serán comentadas posteriormente.

3.2 Relevancia medioambiental

P. aeruginosa, al igual que bacterias similares, se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente, siendo un habitante común en suelo, agua y plantas. Esto se debe principalmente a su capacidad para adaptarse a diversos entornos y condiciones, incluyendo aquellos con condiciones adversas. Algunas de las condiciones adversas a las que *P. aeruginosa* se puede llegar a encontrar son altas temperaturas, pH extremos y concentraciones variables de sales. Además, se ha demostrado el papel que tiene esta especie bacteriana en procesos de biorremediación. Estudios demuestran que es capaz de presentar efectos significativos en la biorremediación de suelos contaminados con características similares a las que se producen en derrames de petróleo¹²⁶. Algunos ejemplos de su aplicación en estas condiciones son el tratamiento de aguas residuales gracias a la producción de exopolisacáridos y la biosorción de contaminantes que comúnmente son producto de la acción humana¹²⁷.

3.3 Relevancia clínica

Aunque la relevancia de *P. aeruginosa* ha sido demostrada a nivel ambiental, en la actualidad su estudio está siendo enfocado principalmente en el ámbito clínico. La Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2017, elaboró una lista de bacterias consideradas como superbacterias, las cuales presentan resistencias para la mayoría, o de varios, de los antibióticos que se utilizan para combatirlas cuando infectan a un huésped. en este caso, el ser humano¹²⁸. Esta lista se ha actualizado en 2024 y se encuentra resumida en la Tabla 2, donde se pueden distinguir tres niveles de prioridad según el grado de peligrosidad que presentan en cuanto a las resistencias a los antibióticos de los que disponemos hoy en día.

Tabla 2: Lista de patógenos prioritarios para I+D de nuevos antibióticos¹²⁹.

RESISTENCIA	
Prioridad 1: CRÍTICA	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenémicos
Enterobacterales	Cefalosporinas de 3 ^{ra} generación
Enterobacterales	Carbapenémicos
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (RR-TB)	Rifampicina
Prioridad 2: ELEVADA	
<i>Salmonella Typhi</i>	Fluoroquinolona
<i>Shigella</i> spp.	Fluoroquinolona
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenémicos
Non-typhoidal <i>Salmonella</i>	Fluoroquinolona
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Fluoroquinolona y cefalosporinas de 3 ^{ra} generación
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina y sensibilidad intermedia/resistentes a vancomicina
Prioridad 3: MEDIA	
Group A Streptococci	Macrólidos
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Macrólidos
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
Group B Streptococci	Penicilina

Por ejemplo, los carbapenémicos son antibióticos conocidos por su eficiencia en casos extremos. Sin embargo, se observa que agentes patógenos como *Acinetobacter baumannii*, causantes de neumonía, infecciones del tracto urinario, de la piel o de heridas, así como el género *Enterobacteriaceae*, relacionado con infecciones gastrointestinales, se encuentran en este grupo de prioridad. Es evidente que el microorganismo principal de esta tesis, la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra a un nivel de prioridad elevada^{129,130}.

Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* son características de un organismo patógeno oportunista^{131,132}. Esta bacteria es considerada responsable de diversas enfermedades, como enfermedades respiratorias crónicas o agudas, así como infecciones cutáneas, entre otras. Estas enfermedades (enfermedades nosocomiales) son comunes en pacientes hospitalizados, personas inmunosuprimidas y pacientes con enfermedades respiratorias del grupo de las bronquiectasias (enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la fibrosis quística (FQ))^{133–137}.

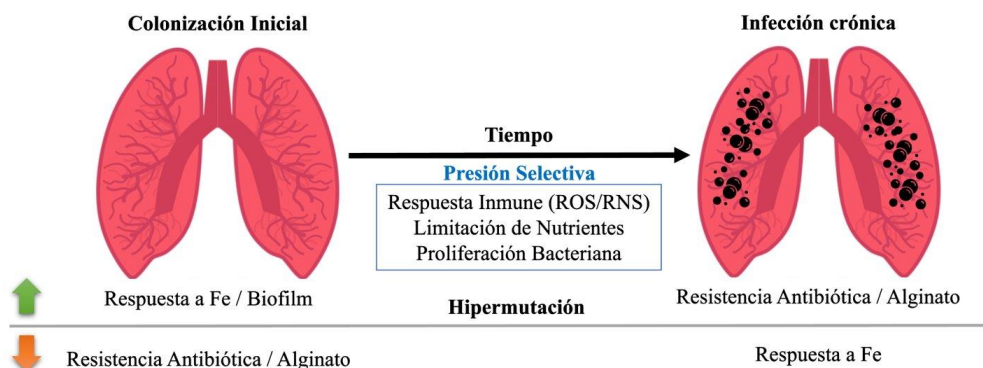


Figura 14: Dinámica de la cronificación pulmonar por la infección de *P. aeruginosa* en un paciente con fibrosis quística. Se muestran los elementos producidos por *P. aeruginosa* en la etapa de colonización inicial y en una infección ya cronificada. Mientras que en los primeros estadios se expresan un gran repertorio de factores de virulencia, con escasa producción de alginato y una alta sensibilidad a los antibióticos, la presión selectiva presente en el ambiente pulmonar provoca una hipermutación transforma este organismo en uno con características de una cepa del tipo mucoide. En esta última fase, el crecimiento es menor, se observa una disminución de los factores de virulencia expresados y una mayor resistencia antibiótica. Figura adaptada de¹³⁸.

P. aeruginosa presenta una amplia gama de factores de virulencia que le confieren la capacidad de colonizar y causar infecciones en diversos hospedadores, incluyendo humanos. Entre estos factores se incluyen las enzimas extracelulares, los sistemas de secreción, las toxinas y los mecanismos de resistencia a los antibióticos, los cuales serán explicados en más detalle en el apartado 3.4 de esta tesis.

3.3.1 Infección, enfermedades y tratamiento de *P. aeruginosa*

Gracias a la versatilidad *P. aeruginosa*, esta es capaz de infectar a cualquier huésped, ya sean plantas, animales o humanos. En el caso de los humanos, este microorganismo es especialmente común en infecciones nosocomiales y/o oportunistas^{131,132,139}. Un ejemplo de esto es un estudio realizado en 2015, en este se observó que aproximadamente el 9% de los pacientes hospitalizados en hospitales españoles presentaban una infección nosocomial, y el 10,13% de estas infecciones eran debidas a *P. aeruginosa*¹⁴⁰. Estas infecciones son especialmente frecuentes en pacientes inmunosuprimidos, y debido a la capacidad de *P. aeruginosa* para infectar cualquier parte del cuerpo, se pueden clasificar según su persistencia en el organismo, ya sean infecciones agudas o crónicas¹³⁶.

Las infecciones agudas generalmente se encuentran en un solo tejido y rara vez llegan a formar un biofilm bacteriano. Estos casos incluyen tejidos del tracto urinario, respiratorio, oído, córneas, tejidos postcirugía, entre otros. Por lo general, las infecciones agudas suelen tratarse mediante el uso de antibióticos, ya que las cepas de *P. aeruginosa*, en este estadio, no han desarrollado biofilm ni son del tipo mucóide lo que permite una alta perfusión de los antibióticos en las bacterias y una eficacia terapéutica elevada. Sin embargo, si se establece un crecimiento en forma de biofilm, esta dinámica cambia y la infección puede persistir durante años, convirtiéndose así en una infección crónica¹⁴¹.

Entre una infección aguda y una crónica, existen estados intermedios en los que las cepas presentes constituyen una mezcla heterogénea de cepas mucoides y cepas no mucoides. Durante una infección crónica, el patógeno, debido a la presión antibiótica, acaba desarrollando resistencias antibióticas y forma un biofilm completamente maduro en el tejido infectado. Por lo tanto, las infecciones crónicas son especialmente relevantes en aquellos pacientes con dificultades respiratorias. Las principales enfermedades que limitan la función respiratoria son las Enfermedades Pulmonares Obstructivas Crónicas (EPOC) y la fibrosis quística (FQ).

La característica principal de la EPOC es la obstrucción irreversible de las vías respiratorias, lo que conlleva una progresiva pérdida de la función pulmonar del huésped. Esta pérdida de función se asocia con un aumento de las infecciones crónicas pulmonares de los pacientes afectados. Estas infecciones son principalmente causadas por organismos como *P. aeruginosa* y *Haemophilus influenzae*. Las enfermedades crónicas, en las que *P. aeruginosa* forma un biofilm maduro y es capaz de realizar un daño en el propio tejido pulmonar mediante la liberación de toxinas y la inducción de una respuesta inmune inflamatoria local, son de gran importancia clínica.

La FQ se caracteriza por la colonización de las vías respiratorias del paciente por microorganismos como *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Burkholderia cepacia*. Se ha observado que *P. aeruginosa* se encuentra presente en el 80% de los casos en los que ocurre esta enfermedad¹⁴², y su desarrollo se divide en dos fases distintas.

La primera fase de la FQ se corresponde a la infección aguda previamente mencionada, durante la cual las vías respiratorias se encuentran infectadas por el patógeno *P. aeruginosa*. Es en esta etapa, es crucial tratar la infección mediante el uso de antibióticos y controlar posibles reapariciones esporádicas del microorganismo para evitar la presencia de cepas mucoides junto a no mucoides (mezcla heterogénea). En el caso de no ser así, la infección en algún momento puede cronificar cuando se obtienen más de 6 meses de cultivo recurrente de *P. aeruginosa*^{143,144}.

Si la infección aguda progresa y se convierte en crónica, se desencadenarán una serie de fenómenos que promoverán la pérdida de función pulmonar y la consecuente atrofia del tejido pulmonar. Estos sucesos incluyen un aumento de síntomas clínicos e infección, una respuesta inmunitaria fuerte y la liberación de toxinas, entre otros factores.

Tabla 3: Resistencia antibiótica de *P. aeruginosa*^{145–148}.

Resistencia antibiótica de *P. aeruginosa*

Resistencias básicas	No resistente	
β-lactámicos	Combinación de β-lactámicos	Piperacilina/tazobactam, Ticarcilina/clavulánico
Macrólidos	β-lactámicos	Carboxipenicilinas - Ticarcilina
Tetraciclinas		Ureidopenicilinas - Piperacilina
Fluoroquinolonas (mayoría)	Fluoroquinolonas	Levofloxacin, Ciprofloxacina
	Cefalosporinas (4ª gen.)	Cefepima, ceftazidima, cefoperazona
	Aminoglicósidos	Gentamicina, tobramicina, amikacina
	Monobactámicos	Aztreonam
	Carbapenémicos	Imioenem/cilastina, meropenem, ertapenem
	Polimixinas	Colistina

El tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa* en pacientes con EPOC y FQ es diverso y depende del momento en el que se administre el tratamiento, ya sea durante una infección aguda o crónica^{145,146}. La erradicación de las infecciones bacterianas se considera lograda cuando los cultivos microbiológicos son negativos durante al menos un año. Sin embargo, eliminar por completo una infección crónica es difícil, y el objetivo principal es mantener la estabilidad del paciente, evitando la pérdida de función pulmonar y las exacerbaciones.

La Tabla 3 muestra las principales resistencias a antibióticos que presenta *P. aeruginosa*, así como los antibióticos a los que no presenta resistencia inicialmente. Sin embargo, se ha observado que puede llegar a generar resistencias a estos últimos si se prolonga su exposición^{147,148}. Por lo tanto, el uso de combinaciones de antibióticos es clave para aumentar su eficacia y así reducir la presencia de mutantes resistentes de forma espontánea¹³⁶.

3.4 Factores de virulencia asociados a *P. aeruginosa*

Los factores de virulencia son aquellas moléculas que sintetiza un microorganismo para facilitar la colonización, la inmunoevasión, inmunosupresión y crecimiento de este en un determinado huésped. Estos factores son de vital

importancia cuando se pretende comprender el desarrollo de una determinada enfermedad o infección. Además, se ha observado que determinados organismos, como las bacterias, poseen una variedad considerable de ellos, provenientes de diversas fuentes. En el caso de *P. aeruginosa* (Figura 15), se han identificado varios factores de virulencia¹³². Uno de ellos es su resistencia a antibióticos, ya que, como se ha mencionado anteriormente, esta bacteria exhibe una gran resistencia antimicrobiana a los β -lactámicos, tetraciclinas, macrólidos y a la mayoría de las fluoroquinolonas^{149,150}. Muchos de estos factores solo están presentes en determinadas fases de la infección bacteriana en el huésped¹³². Estas fases se pueden dividir en tres: la adhesión y la colonización de la superficie a infectar, el aumento de la resistencia que presenta la bacteria para enfrentarse al sistema inmune del huésped (invasión) y, por último, la diseminación de la infección bacteriana¹³².

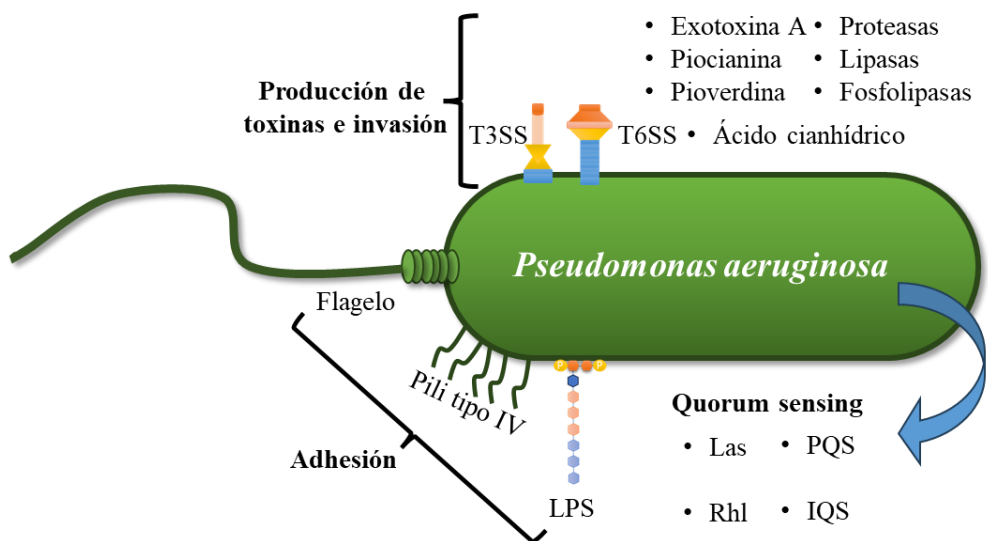


Figura 15: Factores de virulencia presentes en *P. aeruginosa*.

Durante la fase de adhesión y colonización, *P. aeruginosa* expresa todos aquellos factores de virulencia que le permiten colonizar la superficie del tejido del huésped, donde las condiciones son favorables para su crecimiento. Por consiguiente, las infecciones producidas por esta suelen ocurrir mayoritariamente a través de la vía respiratoria o en tejidos donde se haya producido una herida o se haya realizado una intervención quirúrgica. Factores como las adhesinas (proteínas capaces de unirse específicamente a membranas), la presencia de flagelo polar y los pilis de tipo IV¹³² son fundamentales para la colonización. Además, elementos como el lipopolisacárido (LPS), implicados en la interacción con las proteínas superficiales del huésped como

la CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)^{134,151} también son necesarios para esta función colonizadora.

Una vez la colonización del huésped ha tenido éxito, *P. aeruginosa* secretará al exterior celular aquellas moléculas que le permitirán enfrentarse al sistema inmune del huésped. Además, estas moléculas también le van a permitir aumentar su resistencia a condiciones ambientales durante el proceso de infección. En este sentido, el sistema secreción de tipo III (T3SS)¹⁵² juega un papel crucial al permitir la secreción de moléculas como toxinas inhibidoras de la formación del citoesqueleto y moléculas que inhiben la formación de proteínas necesarias para el huésped, lo que a su vez impide la fagocitosis bacteriana¹⁵³. Además, intervienen numerosos sistemas de dos componentes presentes en *P. aeruginosa*¹⁵⁴, aunque no se abordarán en detalle en esta tesis.

Posteriormente, la bacteria lleva a cabo la diseminación utilizando diferentes moléculas que rompen membranas celulares, como proteasas, fosfolipasas y lipasas. Algunas de las proteasas presentes en este microorganismo son la proteasa alcalina, la proteasa IV, LasA y LasB. Estas proteínas permiten la invasión a través de la matriz extracelular de los tejidos y contribuyen con la evasión del sistema inmunitario del huésped¹³². Otras proteasas que participan en la inhibición de la síntesis proteica, como la exotoxina A, también tienen un papel importante en la diseminación bacteriana. Además, moléculas como la pioverdina (que actúa como un sideróforo captando hierro del medio) y la piocianina (involucrada en la inhibición del funcionamiento ciliar en el tracto respiratorio que, además, induce la respuesta a especies reactivas del oxígeno) desempeñan un papel crucial en la diseminación en vías respiratorias^{152,155}.

En pacientes infectados con *P. aeruginosa*, se ha observado la presencia de vesículas extracelulares que tienen cierta relevancia en la patogenicidad de esta bacteria¹⁵⁶. La composición en el interior de estas vesículas es muy diversa y se ha visto que, en determinadas condiciones ambientales estresantes (estrés oxidativo, estrés celular o desnitrificación), las moléculas correspondientes al sistema SOS o a los sistemas de *quorum sensing* (QS) son comunes en estas. En este último caso, se ha visto que estos sistemas se encuentran interconectados por los sistemas de quorum sensing (Las, Rhl, IQS, PQS), lo que ayuda a la comunicación intercelular entre bacterias y contribuye a la expresión de genes involucrados con la formación de biofilm, cambios en la motilidad celular y modificaciones en la expresión de factores de virulencia^{157,158}.

3.4.1 Biofilm: matriz y formación

Los biofilms son comunidades bacterianas, generalmente multiespecie, que se adhieren a una superficie y se encapsulan en una matriz extracelular polimérica e hidratada^{159,160}. Esta matriz proporciona a las bacterias una protección que potencia su supervivencia en ambientes adversos, ya que puede resistir factores como la desecación, cambios de temperatura, cambios osmóticos la acción y de la gran mayoría de los antibióticos disponibles hoy en día para combatir infecciones crónicas. Además, el biofilm es una buena herramienta que presentan las bacterias para evadir el sistema inmune humano, siendo capaz de evitar la fagocitosis, la acción de los anticuerpos y las especies reactivas de oxígeno producidas por neutrófilos, entre otros mecanismos^{161–164}.

Las bacterias asociadas a la matriz experimentan cambios transcriptómicos significativos, como: la pérdida de flagelos y fimbrias (que afectan la motilidad bacteriana) y cambios metabólicos^{165,166}. Estos cambios, junto al aumento en la densidad celular, provocan la aparición de gradientes de concentración a lo largo del biofilm (nutrientes, oxígeno y productos metabólicos)¹⁵⁹. La compleja estructura de la matriz producida por las bacterias dificulta la perfusión de compuestos antimicrobianos y de nutrientes, lo que reduce el crecimiento bacteriano y disminuye la efectividad de compuestos antimicrobianos, como los antibióticos, hasta mil veces en comparación con las bacterias planctónicas¹⁶⁷.

El biofilm consta de varios componentes, donde el 10% del total de la biomasa se encuentra en las células que lo integran, mientras que el 90% restante lo forma la sustancia polimérica extracelular (EPS). Esta EPS se produce por los propios microorganismos que habitan el biofilm y se compone principalmente por agua, polisacáridos, proteínas, ADN extracelular (eADN) y lípidos^{161,168,169}.

La formación de un biofilm se inicia en respuesta a los estímulos ambientales como el pH, la concentración de oxígeno, el estrés inducido por compuestos antimicrobianos, la temperatura, entre otros^{164,170}. Este proceso involucra tres fases principales: la adhesión superficial inicial, el desarrollo o maduración y la fase de dispersión, tal y como se muestra en la Figura 16.

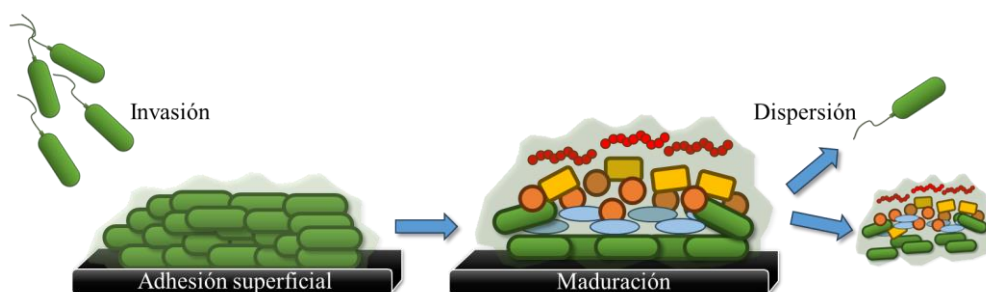


Figura 16: Etapas de la formación de un biofilm bacteriano. En la adhesión inicial en una superficie, se forma una monocapa bacteriana en la que las bacterias secretan polímeros específicos que facilitan una adhesión fuerte que suele ser irreversible¹⁷¹. Durante la maduración del biofilm, se desarrolla la matriz extracelular que envuelve a los microorganismos, los conecta y les permite formar capas¹⁷¹. Esta arquitectura formando capas se le suele llamar microcolonia y es en esta, mediante canales líquidos, en la que nutrientes, oxígeno y desechos son transportados¹⁷². Además, en esta fase los sistemas de QS participan en la comunicación interbacteriana, coordinando la expresión génica en respuesta de los cambios ambientales y al estado de agregación celular¹⁷³. La fase final del ciclo del biofilm implica la dispersión de este, donde intervienen enzimas y surfactantes que facilitan la liberación de los microorganismos embebidos en esta estructura¹⁶⁴. Se ha observado que los surfactantes son fundamentales para la evasión inmunológica por parte de los microorganismos, ya que tienen la capacidad de destruir los leucocitos del huésped¹⁷⁴. Por tanto, La dispersión del biofilm es un proceso crítico para la propagación de la infección bacteriana y su capacidad de colonizar nuevas superficies.

3.5 Sistemas y problemas en la tinción diferencial para el estudio de biofilms bacterianos. Plásmidos y proteínas fluorescentes

La expresión génica en los microorganismos, influenciada por las condiciones ambientales, constituye el principal mecanismo mediante el cual las bacterias regulan y modulan los procesos biológicos. Por lo tanto, el estudio de la expresión génica como los resultados fenotípicos, mediados por el ambiente, son de vital importancia para comprender los mecanismos dinámicos de los organismos¹⁷⁵.

Es por ello que se han desarrollado herramientas para investigar la expresión génica y su regulación en respuesta a las condiciones ambientales. Las proteínas fluorescentes (PF) son un claro ejemplo de estas herramientas y han sido fundamentales para el estudio no invasivo de la expresión génica, tanto *in vivo* como *in vitro*. Aunque la *green fluorescent protein* (GFP)¹⁷⁶ es considerada por muchos la mejor PF, en la actualidad existen numerosas opciones que abarcan todo el espectro

visible de la luz UV-visible. La diferencia de estas PF se basa en sus propiedades bioquímicas, el brillo y la fotoestabilidad. Estas características se encuentran en desarrollo y se mejoran continuamente^{177,178}.

El uso de las PF en la investigación científica es variado, pero en esta tesis nos centraremos en su aplicación para el estudio de la expresión génica, lo que implica el empleo de plásmidos, lo que nos hace plantear la siguiente pregunta, ¿cuáles son las estrategias más usadas cuando se combinan plásmidos y PF?

La primera estrategia implica fusionar transcripcionalmente los promotores de los genes de interés a estudiar y las proteínas fluorescentes (Figura 17). Esto da lugar a lo que se conoce como *promoter-probe vectors*^{179,180}. Estos vectores se usan principalmente para medir la actividad promotora del gen de interés bajo condiciones específicas, empleando el microorganismo deseado.

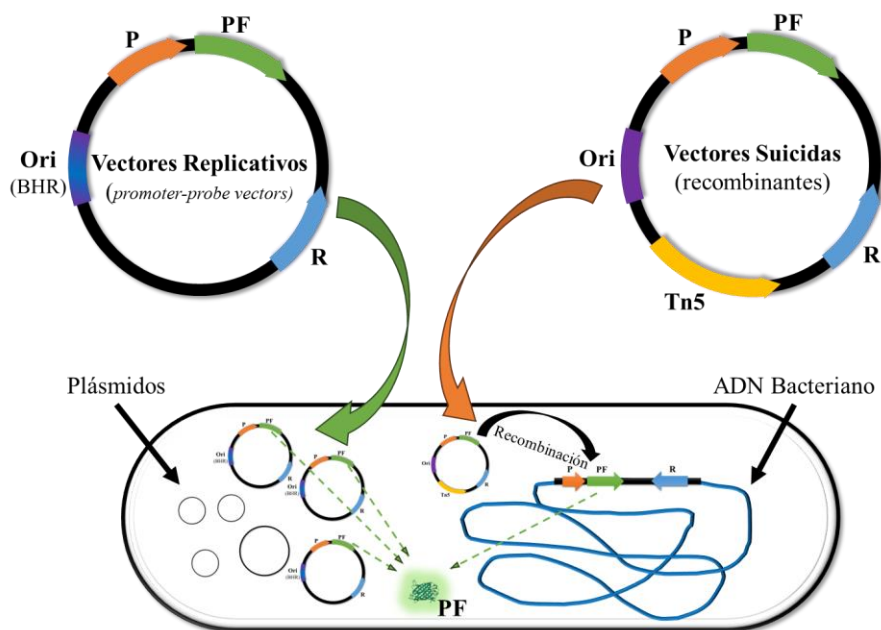


Figura 17: Esquema del funcionamiento de los vectores usados para la expresión de proteínas fluorescentes en bacterias. Los principales componentes de los vectores son: el/los orígenes de replicación (Ori) que pueden ser de amplio rango de hospedadores (BHR)¹⁸¹ o no, el promotor del gen de interés (P), el gen que codifica la proteína fluorescente reportera (PF), la resistencia antibiótica (R) que permite la selección y mantenimiento del plásmido en las cepas bacterianas y el sistema de inserción cromosómica aleatoria mediante la trasposasa TnpA (Tn5) como ejemplo^{182,183}.

A pesar de que los vectores mencionados anteriormente disponen de características que han beneficiado la investigación científica, también presentan una serie de inconvenientes en su uso. Entre ellos, se pueden destacar los siguientes: presencia de múltiples copias de los plásmidos por célula, disparidad en la estequiometría entre promotor estudiado y reguladores presentes en la célula¹⁸⁴, aleatoriedad en la persistencia de los vectores en la unidad celular en el caso de ausencia de presión selectiva continua (comúnmente proporcionada por el uso de resistencias antibióticas)¹⁸⁵ y posible alteración significativa de la expresión génica producida por el condicionamiento de presentar una resistencia antimicrobiana en caso de aplicar una presión selectiva^{186,187}. En el caso del estudio de biofilms, su investigación se ve comprometida por una alta resistencia a los antimicrobianos y la complejidad de los biofilms cuando estos son polimicrobianos y presentan susceptibilidades antimicrobianas distintas, tal y como se ha detallado en el apartado 3.4.1 de la tesis.

La segunda estrategia se basa en el uso de inserciones cromosómicas en el genoma bacteriano (Figura 17). La inserción cromosómica del material genético que contiene la construcción promotor-PF se realiza mediante el uso de elementos móviles proporcionados por vectores suicidas, los cuales no pueden replicarse dentro de la célula huésped¹⁸⁸⁻¹⁹¹. Los beneficios del uso de esta estrategia son: la conservación en la estequiometría entre el promotor génico de interés y los elementos reguladores de la célula, la elusión del elemento que confiere la resistencia antimicrobiana y que ayuda a la supresión de la presión selectiva de los antibióticos¹⁸⁴ etc.

3.6 *Galleria mellonella* como organismo modelo de infección

Galleria mellonella es un insecto lepidóptero comúnmente conocido como la polilla de la cera, debido a su proliferación considerable en las colmenas de abejas como hábitat preferente. Actualmente, se ha convertido en un modelo emergente utilizado en investigación debido a la búsqueda de organismos altamente versátiles y efectivos para comprender el desarrollo de enfermedades ocasionadas por microorganismos, tal y como se demuestra en la Tabla 4. El ciclo de vida acelerado de *G. mellonella*, que transcurre en un período de 8 semanas a temperaturas que oscilan entre 29 y 39 °C y niveles elevados de humedad, se divide en cuatro etapas distintivas: la fase de huevo, la fase larval, la fase de pupa y, por último, la fase adulta^{192,193}. Esta especie se ha convertido en un recurso valioso para la caracterización de infecciones, un fenómeno que ha cobrado relevancia a partir de la década de 2010 y que se mantiene en la actualidad¹⁹⁴. Además de presentar un rápido

ciclo de vida, *G. mellonella* posee una serie de características que resultan de lo más atractivas para el estudio de *P. aeruginosa* y otras bacterias.

Tabla 4: Principales organismos testados en *G. mellonella*.

ORGANISMOS	Testados en <i>G. mellonella</i>	
BACTERIA	Gram-positiva	<i>Streptococcus pyogenes</i> ¹⁹⁵ <i>Streptococcus pneumoniae</i> (neumococo) ¹⁹⁶ <i>Enterococcus faecalis</i> ¹⁹⁷ <i>Enterococcus faecium</i> ¹⁹⁸ <i>Staphylococcus aureus</i> ¹⁹⁹ <i>Listeria monocytogenes</i> ²⁰⁰
	Gram-negativa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ²⁰¹ <i>Escherichia coli</i> ²⁰² <i>Klebsiella pneumoniae</i> ²⁰³ <i>Legionella pneumophila</i> ²⁰⁴ <i>Acinetobacter baumannii</i> ²⁰⁵ Varias de género <i>Burkholderia</i> ²⁰⁶
BACTERIÓFAGOS	Fagos contra	<i>P. aeruginosa</i> ²⁰⁷
HONGOS Y LEVADURAS ²⁰⁸		<i>Candida</i> spp. ^{209,210}

Algunas de las características que supone utilizar *G. mellonella* como modelo para el estudio de infecciones bacterianas son:

Aspectos económicos: El mantenimiento y la cría de estos lepidópteros son económicos en el laboratorio y permiten un control riguroso de las condiciones experimentales. Además, su manipulación es técnicamente sencilla y éticamente favorable en comparación con otros organismos reduciendo. Esto último reduce la necesidad de experimentación con animales de mayor tamaño. Por ejemplo, no requiere de aprobaciones éticas como otros mamíferos como ratones¹⁹².

Similitud con mamíferos vertebrados: A pesar de su pequeño tamaño y estructura simple, *G. mellonella* comparte características biológicas fundamentales con los mamíferos, lo que lo convierte en un modelo ideal para estudiar las interacciones microbianas en un contexto más cercano al humano. Esto incluye similitudes en la respuesta inmunológica innata, como la activación de células fagocíticas (hemocitos) en la hemolinfa, que también tienen la función de encapsulación y coagulación, y la producción de citocinas. Sin embargo, carece de respuesta inmune adaptativa¹⁹².

Gran número muestral y rapidez: Cada generación da lugar a muchos individuos debido a su rápido ciclo de vida. Debido a esto, se obtienen muchas larvas para poder realizar experimentos con números muestrales muy grandes en cada ensayo experimental¹⁹². Su tamaño y su ciclo de vida corto facilitan la realización de experimentos en un período de tiempo relativamente corto. Esto último resulta beneficioso para estudios de microbiología que precisan de resultados rápidos¹⁹².

Respuesta humoral: se ha visto que puede ejercer una respuesta humoral gracias a la implicación por parte de moléculas efectoras solubles similares al complemento, la melanina y péptidos antimicrobianos. Todas estas moléculas son capaces de inmovilizar o acabar con patógenos¹⁹².

Brevemente, la anatomía de la larva se divide en 3 partes: cabeza, tórax y abdomen con patas y pseudopatas, tal y como se puede ver en la Figura 18.

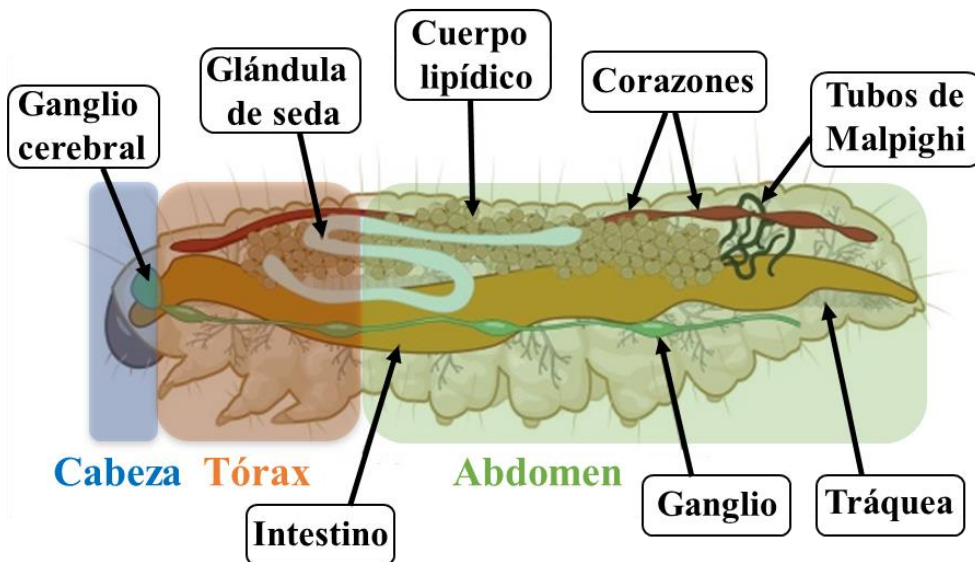


Figura 18: Anatomía general de la larva de *Galleria mellonella*. En la imagen se indican las diferentes macroestructuras de la larva usando recuadros de colores: azul para la cabeza, naranja para el tórax y verde para el abdomen. Se indican mediante flechas los principales órganos y tejidos de la larva. Figura adaptada de²¹¹.

La hemolinfa que contiene *G. mellonella* es importante para la respuesta inmune, ya que es el líquido circulatorio que se disemina en la larva y produce la respuesta inmune celular y humoral. Además, propicia la melanización, un fenómeno en el que la melanina contiene las infecciones dando un color negro a la larva²¹².

Para realizar el estudio de infecciones usando como modelo a *G. mellonella* se emplea el método de infección conocido como inyección intra-hemocélica. Esta se basa en atravesar con una aguja una de las pseudopatas traseras del artrópodo. Con esto último se consigue penetrar en la cavidad hemocélica de las larvas donde el microorganismo en cuestión se disemina rápidamente por todo el organismo²¹².

Hipótesis y Objetivos

Esta tesis se centra en dos aspectos principales: primero, en el estudio de la regulación transcripcional del gen *nrdR* como posible diana antimicrobiana, y segundo, en el desarrollo de una nueva técnica innovadora para monitorizar la expresión génica bacteriana bajo condiciones ambientales dinámicas.

Por un lado, se ha investigado la regulación transcripcional del gen *nrdR* en *Pseudomonas aeruginosa*, identificando los factores transcripcionales asociados a su regulación, cuyo mecanismo molecular aún es poco conocido. Por otro lado, buscamos desarrollar una metodología sencilla y de fácil aplicación en el laboratorio que permita utilizar una batería de vectores fluorescentes para cuantificar la expresión génica múltiple en condiciones de crecimiento en biofilm y durante la infección.

Los objetivos específicos de este trabajo son los siguientes:

1. Estudiar la regulación transcripcional del gen *nrdR* en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Escherichia coli* MG1655.
2. Analizar los cambios transcripcionales del gen *nrdR* y de sus reguladores transcripcionales durante la formación de biofilm y el proceso de infección en *Galleria mellonella*.
3. Desarrollar una nueva técnica para cuantificar la expresión múltiple de genes bacterianos mediante una batería de vectores fluorescentes.

Metodología

La metodología se describe en la sección de resultados, presentada en capítulos con una estructura similar a la de un artículo científico.

- Metodología del Capítulo 1 – Página 48
- Metodología del Capítulo 2 – Página 91

Resultados

Los resultados de esta tesis están presentados en formato de artículo científico y se han organizado en los capítulos 1 y 2:

- Resultados del Capítulo 1 – Página 53
- Resultados del Capítulo 2 – Página 96

Capítulo 1:

FleQ controls gene expression of nrdR, the master regulator of ribonucleotide reductases in Pseudomonas aeruginosa.

Domingo Marchan¹, Alba Rubio¹, José María Hernández², Joana Admella¹, Eduard Torrents^{1,3*}

Capítulo 2:

Novel Fluorescent Reporter Vectors for Monitoring Bacterial Promoter Activity under different environmental condition

Domingo Marchan¹, Alba Rubio-Canalejas¹, Núria Blanco-Cabra^{1,2}, Eduard Torrents^{1,2*}

Capítulo 1: FleQ controls gene expression of *nrdR*, the master regulator of ribonucleotide reductases in *Pseudomonas aeruginosa*.

Domingo Marchan¹, Alba Rubio¹, José María Hernández², Joana Admella¹, Eduard Torrents^{1,3*}

¹Bacterial Infections: Antimicrobial Therapies, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain.

²Proteomics and Metabolomics Core Facility, Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain.

³Microbiology Section, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, 643 Diagonal Ave., 08028, Barcelona, Spain.

*Corresponding author; Eduard Torrents, e-mail: etorrents@ibecbarcelona.eu.

Autoría:

Domingo es el primer autor, ya que participó activamente en el diseño, ejecución y análisis de todos los experimentos y figuras, además de ser el responsable de la redacción del manuscrito. La Dra. Alba Rubio colaboró en la optimización de la formación de los biofilms, mientras que Joana Admella contribuyó al diseño y supervisión de los experimentos con el modelo animal de *Galleria mellonella*.

Abstract

Ribonucleotide reductases (RNRs) are essential enzymes involved in DNA synthesis and repair, catalyzing the conversion of ribonucleotides to deoxyribonucleotides (dNTPs). While all living cells possess at least one RNR encoded in their genome, certain organisms, such as *Pseudomonas aeruginosa*, encode multiple RNR classes. This multiplicity provides a competitive advantage, allowing these organisms to adapt and colonize different environments. Despite their importance, the mechanisms coordinating the expression of different RNRs in microorganisms with multiple RNR classes remain poorly understood. The transcriptional regulator NrdR has been implicated in controlling the expression of all three RNR classes in *P. aeruginosa* by binding to conserved NrdR boxes within the promoter regions of the RNR genes.

To gain insights into the regulation of the different RNR genes, it is first necessary to understand how *nrdR* itself is transcriptionally regulated. In this study, we employed a bioinformatics approach to identify potential transcription factors (TF) involved in *nrdR* regulation. We combined this with promoter-probe vectors *nrdR* promoter fusions to investigate *nrdR* transcriptional regulation and identify TFs that modulate its expression *in vitro*. Our analysis identified four potential TF that could regulate *nrdR*, and we experimentally confirmed that FleQ is responsible for regulating *nrdR* expression under aerobic and anaerobic conditions. Furthermore, we explored *nrdR* regulation under biofilm-forming conditions and in the *Galleria mellonella* infection model to gain insights into how *nrdR* might be regulated *in vivo*.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium of increasing medical relevance. Known as an opportunistic pathogen, *Pseudomonas aeruginosa* is responsible for several acute and chronic infections, including cystic fibrosis (CF)¹, among others. It has a remarkable ability to adapt to diverse environments, primarily due to its capacity to regulate gene expression in response to environmental stimuli². However, its presence in hospitals, where antibiotics are frequently used, poses a significant risk due to the rapid development of antibiotic resistance³. The acquisition of antibiotic resistance is a growing concern, prompting the development of various strategies to combat it⁴. One such strategy involves identifying molecular targets⁵, that are essential for bacterial survival.

All organisms require active DNA synthesis and repair, and the only biochemical pathway for *de novo* deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) synthesis being catalyzed by the enzyme ribonucleotide reductase (RNR). RNRs catalyze the reduction of ribonucleotides to deoxyribonucleotides, the building blocks of DNA synthesis and repair⁶. Without this enzymatic reaction, bacteria cannot survive⁶. Moreover, all organisms possess at least one of the three RNR classes (I, II, and III), which are distinguished by their structural differences, metallocofactor requirements, and mechanisms for radical generation^{6–11}. Notably, *P. aeruginosa* encodes all three RNR classes (Ia, II, and III) in its genome¹². This capacity provides *P. aeruginosa* with a significant advantage in adapting its metabolism to varying conditions during infection, making RNRs a perfect molecular target.

Research into RNR regulation has advanced significantly, and over the past few decades, various transcriptional regulators have been identified that control the expression of different *nrd* genes. One such regulator is NrdR. A negative transcriptional regulator. scientifically, and over o are gradually gaining a better understanding of RNR regulation. Over the last few decades, different transcriptional regulators have been identified to control the expression of different *nrd* genes. One such regulator is NrdR, a negative regulator of RNR of these^{12,13}.

NrdR was first discovered upstream of the Class II RNR gene (*nrdJ*) in *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces clavuligerus*¹⁴. It is widely distributed across the bacterial domain, and its genome location is often clustered with RNRs genes^{15,16}, upstream of genes involved in DNA metabolism (*dnaB* and *dnaI*)¹⁵, or adjacent to riboflavin biosynthetic operons, depending on the microorganism^{15,16}. The regulation of RNRs by NrdR depends on the presence of NrdR binding sites (termed NrdR-boxes¹⁵) in their regulatory regions. These boxes are typically found in tandem, although in some cases, only a single NrdR-box may regulate a gene¹⁵. The NrdR

protein, which consist of 140-200 amino acids, has a structure that has been well characterized¹⁷. It comprises two main domains: an N-terminal Zn-finger domain and a central ATP-cone domain, with some variations having a C-terminal segment of variable length^{6,16-18}. The N-terminal domain contains a zinc ribbon motif that binds to RNR promoter regions, while the ATP-cone domain is analogous to the allosteric activity domain observed in some RNRs⁶, with a function closely tied to intracellular dNTPs levels¹². Changes in dNTP levels after the conformation of the ATP-cone domain, enabling DNA recognition. Other studies have revealed the complex regulation of NrdR, involving a mechanism of cooperative and allosteric nucleotide binding by ATP (adenosine triphosphate) and dATP (deoxyadenosine triphosphate)¹⁸. Additionally, it has been found that the ATP-cone domain controls oligomerization, which in turn modulates NrdR's DNA binding to the NrdR-box¹⁷. Despite these insights, significant gaps remain in our understanding of how *nrdR* is regulated in different bacterial species. For instance, our research has shown that *nrdR* in *P. aeruginosa* is regulated under anaerobic conditions by the NarL negative regulator¹².

In this study, we used a combination of a transcription factor (TF) bioinformatics approach and the identification of transcriptional regulators that directly bind to the *nrdR* promoter region to advance our understanding of the *nrdR* transcriptional regulation. We identified FleQ as a new transcriptional regulator involved in the *nrdR* regulation. Furthermore, we explored the significance of *nrdR* regulation by FleQ both *in vitro* during biofilm growth and *in vivo* using *Galleria mellonella* as an infection model¹⁹.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains used in this study, listed in Supplementary Table S1, were routinely grown in Luria-Bertani broth (LB) at 37 °C. *Escherichia coli* BL21(DE3) was used for protein overproduction, while *E. coli* DH5 α was used for plasmid construction procedures. For *P. aeruginosa*, anaerobic growth was performed in screw-cap tubes (Hungate Tubes) containing LB medium + 1% w/v KNO₃ (LBN) and filled to the top with N₂. When needed, antibiotics were added at the following concentrations: for *E. coli*, 10 μ g ml⁻¹ gentamicin, 17 μ g ml⁻¹ chloramphenicol, 50 μ g ml⁻¹ kanamycin, 50 μ g ml⁻¹ ampicillin; for *P. aeruginosa*, 100 μ g ml⁻¹ gentamicin, 300 μ g ml⁻¹ carbenicillin. When needed, 0.1 mg/mL of c-di-GMP (Sigma) was added.

DNA manipulation and plasmid construction

All plasmids used in this study are listed in Supplemental Table S1. PCR primers are listed in Supplemental Table S2. The *P. aeruginosa* PAO1 genomic DNA (gDNA) was amplified using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Plasmid extractions and purifications were performed using the GeneJET Plasmid MiniPrep Kit (ThermoFisher Scientific). DNA digestion was carried out using restriction enzymes (ThermoFisher Scientific), and ligation was performed using T4 DNA ligase (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). All PCR products and digested DNA fragments were purified using the GeneJET Gel Purification Kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Purified PCR products were first cloned into the pJET1.2 plasmid (ThermoFisher Scientific) and then into pETS130, pUCP20T, or pETS220-BIATlux using *Bam*HI/*Cla*I, *Xba*I, or *Sac*I/*Eco*RI restriction enzymes, respectively. Cloning results were verified by colony PCR using DreamTaq Polymerase Master Mix (ThermoFisher Scientific) with primers 1 and 2 for pETS130, pUCP20T or pETS220-BIATlux constructions, and primers 3 and 5 for pJET1.2 constructs. *P. aeruginosa* strains were transformed by electroporation as previously described²⁰.

Bioinformatic identification of transcriptional factors

In this study, we considered the *P. aeruginosa* PAO1 *nrdR* promoter region (*PnrdR*), comprising 355 bp upstream of the translation start site (ATG) of the *nrdR* gene (PA4057) (see Figure 1D). This sequence was retrieved from the *Pseudomonas* Genome DB (ID: 110934) (www.pseudomonas.com).

The bioinformatics approach used PRODORIC2 software²¹ with the Virtual Footprinting tool to retrieve a list of putative transcriptional factor (TF) binding sites associated with *nrdR* promoter regulation. Bioinformatically predicted TFs were detected using all PRODORIC2 Position Weight Matrices (PWMs) corresponding to known *P. aeruginosa* sequences. Hits were considered positive if they obtained a score >5 and were encoded on the same strand (see Figure 1C).

Site-directed mutagenesis of Transcriptional factors binding sites

Site-directed mutagenesis of the putative transcriptional factor binding sites (FleQ and NarL), identified through bioinformatic analysis in the *nrdR* promoter region, was performed by random mutagenesis using the following primers by PCR-overlap²² extension in combination with the *PnrdR* amplification primers 6 to 11 as previously described¹². Additionally, we used the *PpelA* amplification primers 12 to 16 to mutagenize the FleQ binding sites as positive controls in all our experiments.

FleQ overproduction

FleQ overproduction was carried out using the Novagen pET system with pET28a plasmid (Novagen) in the *E. coli* BL21 (DE3) strain. The entire *P. aeruginosa* PAO1 *fleQ* sequence was cloned into pET28a as a PCR product using the primers 17 and 18 to generate the pET28a:*fleQ* plasmid. A 20 ml *E. coli* BL21(DE3) culture with the appropriate antibiotics was inoculated to an OD₅₅₀ of 0.05. The culture was incubated at 37 °C until OD₅₅₀ reached 0.5, at which point 1 ml sample was taken (T=0; induced). Induction was carried out with 0.1 to 1 mM of Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG), with or without 0.1 mg of c-di-GMP. The induced culture was then incubated for 3-4 h at 37 °C or overnight at 15°C, and two additional samples (0.5 ml/10 ml) were taken. Crude extracts were prepared using the BugBuster extraction reagent (Sigma). FleQ protein production (soluble and insoluble protein) was analyzed by 7.5% SDS-PAGE gel (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel-BioRad) and Coomassie-staining.

RNA extraction, RT-PCR, and transcriptional start site determination

The different *P. aeruginosa* strains used in this study were cultured until reaching an OD₅₅₀ of 0.4-0.6 (exponential phase) and 2.2-2.5 (stationary phase). At this point, cells were centrifuged and resuspended in 500 µl of RNeasy Lysis Solution (ThermoFisher Scientific). Total RNA was extracted using an RNeasy Mini kit (Qiagen), followed by DNase I treatment (ThermoFisher Scientific) to remove contaminating DNA. 1 µg of RNA was reverse transcribed using iScript (Bio-Rad). Real-time PCR (RT-PCR) was performed using Power SYBR Green Master Mix (ThermoFisher) with 1 µl of cDNA as the template and 200 nM of primers 19 and 20, primers 21 and 22, and primers 23 and 24. Cyclic parameters were established according to the manufacturer's instructions. The ABI Step One Plus detection system (Applied Biosystems) was used to detect RT-PCR amplification, with *gapA* used as a standard control¹².

To determine the transcriptional start site (TSS) of the *nrdR* gene, the 5'-RACE technique was employed using RNA samples collected under aerobic and anaerobic conditions at an OD₆₀₀ of 0.5. Reverse transcription was carried out as previously described, and the resulting cDNA was purified. The addition of a poly-A tail was performed using Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (ThermoFisher Scientific), followed by two consecutive PCRs to obtain a poly-adenylated cDNA (PCR1) and amplify its signal (PCR2). PCR1 was conducted using the general poly-T and primer 25, while PCR2 was conducted using the primer 26. The final purified DNA fragments were cloned in the pJET1.2 plasmid and transformed into *E. coli* DH5α. Transformant colonies were PCR-screened, and the plasmids were sequenced using primers 3 and 5 and further purified. The orientation of the cloned fragment was determined using primer 26.

Transcriptional expression during planktonic and biofilm growth

DNA fragments of *PnrdR* and their variants with mutated TF boxes were amplified and cloned into the promoter-probe vector pETS130, allowing transcriptional fusion between *PnrdR* promoters and a green fluorescent reporter gene (GFP)²³ generating the following vectors: pETS130:*PnrdR*(PAO1), pETS130:*PnrdR*(PAO1) ΔFleQBox, pETS130:*PnrdR*(PAO1) ΔNarLBox1&2. We did the same for *PpelA* promoters, generating the following vectors: pETS130:*PpelA*(PAO1), pETS130:*PpelA*(PAO1) ΔFleQBox1, pETS130:*PpelA*(PAO1) ΔFleQBox2. Gene expression was measured under planktonic or biofilm-forming conditions.

Planktonic sample were taken at the early exponential phase (OD₅₅₀ of 0.45 to 0.55) and the late stationary phase (OD₅₅₀ of 2.5 to 4.0). All GFP fluorescence emissions (λ_{ex} 485 nm / λ_{em} 535 nm) were corrected by OD₅₅₀, as previously described²⁴.

Static biofilms were grown in 96-well microtiter plates (Corning, Inc. Costar). Three-day biofilms were developed, and GFP fluorescent values were measured as previously described²⁴. Fluorescence values were corrected by the total biomass measured by crystal violet staining²⁵, where acetic acid (33 % solution) was used as a resuspension agent. OD₅₇₀ was measured to calculate biofilm biomass²⁴.

For continuous biofilm studies, cultures of *P. aeruginosa* PAO1 carrying different plasmids were adjusted to an OD₅₅₀ of 0.3 and inoculated into a three-channel flow cell system as previously described²⁶. After 4 h of bacterial incubation, LB medium supplemented with 0.2% glucose was pumped through the flow cells at room temperature at a constant flow rate of 42 $\mu\text{L}/\text{min}$ using an Ismatec ISM 943 peristaltic pump (Ismatec, Wertheim, Germany). After 72 h, the biofilm was stained with 10 μM SYTO60 reagent for 30 min (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and visualized using a Zeiss LSM 800 confocal laser scanning microscope (CSLM) with excitation wavelength of 488 and 640 nm. Microscope images were processed using ImageJ and COMSTAT 2 software was used to quantify biofilm biomass²⁷.

To complement the *P. aeruginosa* PAO1 *AfleQ* mutation, the pUCP20T:*PfleQ::fleQ* plasmid was used. The insert sequence was obtained using primers 27 and 28 and cloned into the pUCP20T plasmid, which had been previously digested with *Xba*I and *Bam*HI.

Pseudomonas aeruginosa nrdR promoter pull-down assay

A biotin/streptavidin-magnetic bead system was used to capture a synthetic sequence carrying a 5'-biotin. First, a synthetic *PnrdR* sequence, repeated three times in tandem, was generated using the GeneArt (ThermoFisher) tool, creating the pMX-*PnrdR*(PAO1)x3 plasmid. This sequence was cloned into pJET1.2b plasmid and transformed into *E. coli* DH5 α . The 5' biotin was incorporated by PCR amplification using primers 4 and 5. *P. aeruginosa* PAO1 crude protein extract was obtained from exponential (OD₅₅₀=0.55) and stationary (OD₅₅₀ >2.5) cultures. The pull-down strategy was performed as previously described²⁸ using M-280 Dynabeads (ThermoFisher) (See Supplementary Figure S1).

All recovered proteins were separated on a 12% SDS-PAGE gel (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel- BioRad) and Coomassie-stained. Digital images of the SDS-Page gel were captured with an ImageQuant™ LAS 4000 mini-imager (GE

Healthcare, Chicago, IL, USA) with a 1/30 second exposure time. The bands were excised and sequenced at the Proteomic and Metabolomics Service at the Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP). The proteins were digested with trypsin following an in-gel enzymatic digestion protocol. Subsequently, 45% of each digested sample was analysed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) using a 60-min gradient on an Orbitrap Eclipse instrument. As a quality control, BSA was digested in parallel, run between samples to avoid carryover, and assess the instrument performance.

Peptide identification was performed using Proteome Discoverer v2.5 with the Mascot v2.6 search algorithm (<http://www.matrixscience.com/>) and the *P. aeruginosa* PAO1 reference proteome database (UP000002438). Peptides were filtered based on a false discovery rate (FDR), and only those with an FDR lower than 1% were retained. An Excel file (see Supplementary Material Excel ExcelPullDown2023MQ037) containing all protein and peptide information was generated using Proteome Discoverer v2.5 software.

Galleria mellonella maintenance and injection

G. mellonella larvae were fed an artificial diet (15% corn flour, 15% wheat flour, 15% infant cereal, 11% powdered milk, 6% brewer's yeast, 25% honey, and 13% glycerol) and reared at 34 °C in darkness, as previously described^{19,29}. Overnight cultures of the different bacterial strains were centrifuged at 4000 rpm (Labnet Spectrafuge™ 6C) for 10 min. The pellets were resuspended in 5 mL of 1× PBS (Fisher Scientific, Madrid, Spain) after three washes. The OD₅₉₀ was equalized to 1, and 10-fold serial dilutions of the equalized culture were made in 1× PBS. *G. mellonella* larvae (200–220 mg each) were injected with 5–20 CFUs per larva through the top right proleg using a 26-gauge microsyringe (Hamilton, Reno, NV, USA). For each condition, groups of 6 larvae were injected and kept at 37 °C during the course of the infection.

PnrdR-Lux transcriptional fusions and promoter-bioluminescence activity measurement using G. mellonella as an infection model.

Transcriptional fusions between the *PnrdR* promoter (or its mutated variants) and the *lux* reporter gene were constructed in the pETS220-BIATlux plasmid, generating the following vectors: pETS220-BIATlux:*PnrdR* and pETS220-BIATlux:*PnrdR* ΔFleQBox. Before measurements, larvae were anaesthetized on ice for 10 minutes. Relative luminescence of infected larvae was measured at 15 hours and 18 hours post-infection using a 6-well microtiter plate (Caplugs Evergreen, Buffalo, NY, USA) and

a 200 Pro Fluorescence Microplate Reader (Tecan, Switzerland) with an integration time of 1000 ms. Results were plotted using GraphPad Prism 9.0 software (San Diego, CA, USA). Chemiluminescence images of the infected larvae were taken with an ImageQuantTM LAS 4000 mini-imager (GE Healthcare, Chicago, IL, USA), with a 30-second exposure time. The pictures were edited with ImageJ FIJI software (Version 1.52p, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)^{19,29}.

Results

nrdR gene context overview and bioinformatic transcription factor identification

This study aims to understand how the *nrdR* gene is transcriptionally regulated and to identify potential transcription factors that may modulate its expression. The *nrdR* gene (PA4057) is part of the *ribD* operon, as previously described (see Figure 1A-B)¹². To precisely identify the promoter region of the *nrdR*, we first experimentally determined its transcriptional start site (+1, TSS). Using the 5'-RACE technique (see Material and Methods), we identified the *nrdR* TSS at -28 bp position relative to the translational start points (see Figure 1D and Supplementary Figure S2) in *P. aeruginosa* under both aerobic (91.7% of the sequences) and anaerobic conditions (in 50% of the sequences). Our RACE results were corroborated by previously published work conducted under the same oxygenic conditions³⁰.

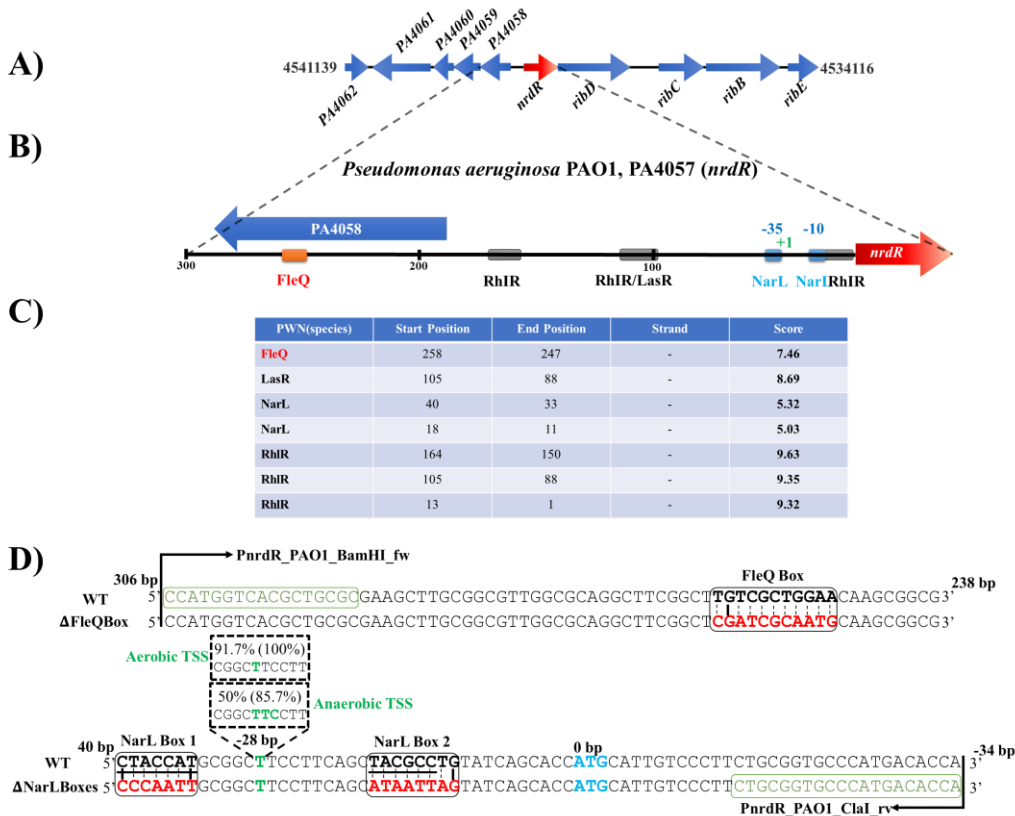


Figure 1. *nrdR* operon organization and transcriptional factors identification. A) Gene organization scheme of the *nrdR-ribD* operon¹². B) The promoter region of the *nrdR* gene and its putative transcriptional factors binding sites are bioinformatically

predicted. C) PRODORIC2 Virtual footprint hits with *P. aeruginosa* position weight matrices (PWM). D) Scheme of *P. aeruginosa* PAO1 *nrdR* promoter showing FleQ/NarL boxes (in bold black) and the corresponding mutated sequences (in red) used in this study. The putative -35 and -10 regions are underlined. The ATG translational start codon is shown in bold blue, and the +1 TSS site is in green.

After pinpointing the exact location of the *nrdR* gene promoter, we bioinformatically identify putative transcription factor binding sites in this regulatory region using the promoter predictor PRODORIC2 Virtual Footprint²¹. We identified seven binding sites: one undecameric FleQ-binding site located 258 bp upstream of the translation start codon, referred to here as the FleQ-Box (TGTCGCTGGAA); one heptadecameric LasR-binding site located 105 bp upstream of the translation start codon, referred to here as the LasR-Box (CTCTCGCCTTTCCCAGC); three RhlR-binding sites located 164, 105 and 13 bp upstream of the translation start codon, referred to here as RhlR-Boxes (CTTGTATAGCGCAA), (CTCTCGCCTTTCCCAGC), (CTGTATCAGCACC); and two heptameric NarL-binding sites located as previously described¹² (see Figure 1B-C). Further analysis of FleQ will be considered later in this work.

The two NarL boxes were located near the predicted -10 (CTACCAT) region (Figure 1D), and their role in anaerobic *nrdR* transcriptional activation was previously described and published by our laboratory¹². Regarding the three RhlR boxes identified (see Figure 1B-C), we further investigated *nrdR* gene expression in an isogenic *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta lasI/rhlI$ mutant strain, as both Quorum Sensing (QS) regulators can bind to similar DNA binding. No significant differences in *nrdR* expression were observed between the wild type and the QS isogenic double mutant ($\Delta lasI\Delta rhlI$), as shown in Supplementary Figure S3. The presence of positive hits for this transcriptional box is common and often associated with false positives. Based on our experimental results, we ruled out any possible involvement of quorum sensing in regulating the expression of the *nrdR* gene.

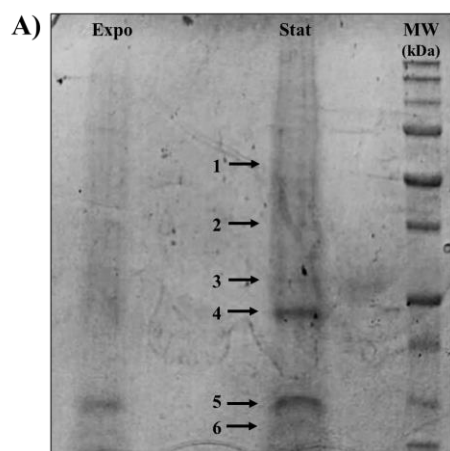
The pull-down confirms that FleQ and NarL bind to the nrdR regulatory region.

To confirm the direct binding of the FleQ regulator to the *nrdR* promoter, we initially aimed to perform an electrophoretic mobility shift assay (EMSA). However, despite attempts to purify the FleQ protein in different overproduction strains, it

remained insoluble, forming clear inclusion bodies under various overproduction conditions (see Supplementary Figure S4 and unpublished results). As an alternative, we employed a proteomic approach and conducted a protein pull-down assay to identify proteins that directly bind to the *nrdR* promoter region.

For this assay, we used a DNA fragment containing a triplicate repetition of the *P_{nrdR}* sequence (from -306 pb to +34 pb) bound to biotin, which was subsequently recovered using streptavidin-magnetic beads (see Materials and Methods and a summary in Supplementary Figure S1). Crude extracts from *P. aeruginosa* PAO1 grown during exponential and stationary growth phases were used in these experiments. The six bands identified in our stationary phase samples were analysed on an SDS page gel, with apparent molecular weights of 50 kDa (Band 1), 37 kDa (Band 2), 27 kDa (Band 3), 24 kDa (Band 4), 15 kDa (Band 5), and 13 kDa (Band 6) (see Figure 2A).

The *P. aeruginosa* PAO1 (UP000002438) proteome served as a reference during analysis (see Materials and Methods). A supplementary Excel file provides a detailed list of the *P. aeruginosa* PAO1 proteome proteins identified in each band using the LC-MS proteomic technique. Our study focused on the coverage percentage and abundance scores of the Master Protein (MP). FleQ was detected with a coverage value of 39%, predominantly found in Bands 1, 2, and 3. Additionally, we detected the NarL regulator, with a coverage value of 5%, in Band 3, corresponding to its specific molecular weight (see Figure 2B). NarL has been previously demonstrated to regulate the *nrdR* gene under anaerobic conditions¹². Notably, the LasR and RhIR transcriptional factors were not identified in the pull-down with significant coverage.



B)

Accession		G3XCV0	Q9HXD3
Description		FleQ	NarL
MW [kDa]		55.2	24.2
Coverage [%]		39	5
Abundance	Band 1	1.19E+07	
	Band 2	1.55E+07	
	Band 3	8.00E+06	1.11E+06

Figure 2. SDS-Page gel of the *P. aeruginosa* PAO1 *nrdR* promoter pull-down assay. A) 12% SDS-Page gel showing the *P. aeruginosa* PAO1 *PnrdR* pull-down assay with protein extracts from cells grown in exponential (Expo) and stationary (Stat) growth phases. Bands of interest are indicated with black arrows and labelled with black numbers. The molecular weight (MW) standard used was the Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards (Bio-Rad). B) Summary of the main Master Protein hits obtained from LC-MS analysis, including FleQ and NarL. The accession numbers correspond to the *P. aeruginosa* PAO1 proteome in the UniProt database (UP000002438). The MW line indicates the theoretical molecular weight of each protein. The Coverage % line indicates the percentage of peptides detected for each Master Protein. The Abundance (m/z) lines indicate the total amount of protein detected in each band.

FleQ regulates nrdR transcription under aerobic and anaerobic conditions.

As we previously identified a FleQ binding site in the *nrdR* promoter region, we further investigated the impact of deleting the chromosomal *fleQ* gene on *P. aeruginosa* growth under both aerobic and anaerobic conditions (Figure 3). The growth curves of the *P. aeruginosa* PAO1 wild-type and its isogenic *fleQ* mutant strain (PW2981; referred to as PAO1 Δ *fleQ*) indicated that both strains displayed similar growth patterns under aerobic conditions, with no significant differences in growth rates even after 8 hours. However, under anaerobic conditions, the *P. aeruginosa* PAO1 Δ *fleQ* strain showed impaired growth, exhibiting a slower growth rate during the mid-to-late stationary phase (approximately 3 h) compared to the wild-type *P. aeruginosa* PAO1 strain (Figure 3A). These findings should be considered when interpreting the results of subsequent experiments under these specific conditions.

Next, we investigated *nrdR* gene expression by RT-PCR in *P. aeruginosa* PAO1 wild-type and its isogenic Δ *fleQ* mutant (Figure 3B). As a gene regulated by FleQ, we used *pelA* as a positive control and the housekeeping gene *gapA* as an internal standard control (see Material and Methods). The mRNA samples were collected under aerobic or anaerobic conditions at two different growth stages: exponential phase ($OD_{550}=0.45$) and stationary phase ($OD_{550}=2.5$), corresponding to active and inactive cell DNA replication, respectively.

The *pelA* gene, which produces the exopolysaccharide required for biofilm formation, contains two experimentally identified FleQ binding sites in its promoter region^{31,32}. Previous studies have shown that FleQBox1 is responsible for

downregulating the *pelA* gene under planktonic conditions³¹. As shown in Figure 3B, the *pelA* gene was highly expressed under both conditions, with 30-45 times higher expression in the absence of the FleQ repressor, consistent with previous findings³². In contrast, we observed that the *nrdR* gene was consistently slightly repressed in the absence of FleQ ($\Delta fleQ$), indicating that FleQ acts as an activator of the *nrdR* transcription under both growth conditions.

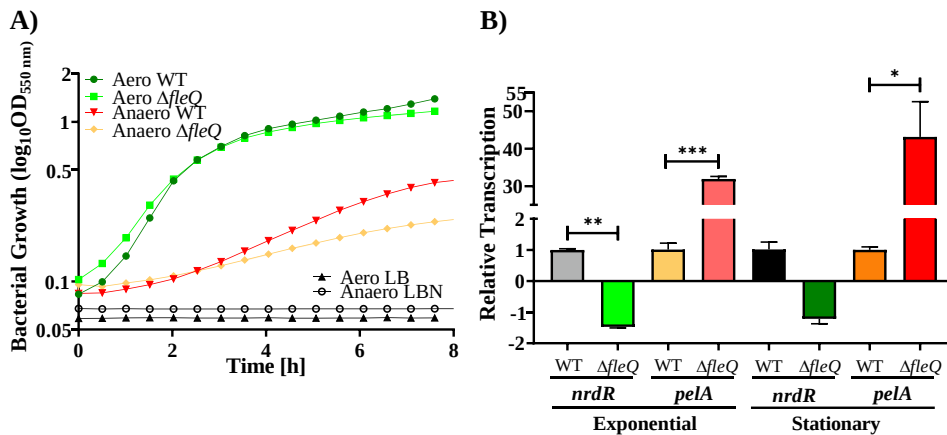


Figure 3. *P. aeruginosa* PAO1 planktonic growth and *nrdR* expression. A) Kinetic growth curves of *P. aeruginosa* PAO1 wild-type and isogenic $\Delta fleQ$ strains under aerobic and anaerobic conditions. Negative controls were LB or LBN without cells. B) Relative *nrdR* and *pelA* RT-PCR gene expression in *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta fleQ$ vs wild-type strains under exponential ($OD_{550} = 0.45$) and stationary ($OD_{550} = 2.5$) aerobic growth phase. The genes analyzed in the study were *P. aeruginosa* PAO1 *nrdR* (green), *pelA* (red) and *gapA* as an internal standard. The means of three independent experiments are displayed, and the error bars represent the positive standard deviation. Statistical analysis was performed using Student's unpaired *t*-test (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$).

To further investigate the regulatory role of FleQ in *nrdR* expression, we generated transcriptional fusions between the *PnrdR* promoter region from *P. aeruginosa* PAO1 and the green fluorescent protein (GFP_{mut3}) as a reporter gene on the pETS130 plasmid, generating plasmid (pETS130:*PnrdR*(PAO1))²³. Additionally, we confirmed the bioinformatic prediction by mutating ten nucleotides in the FleQ binding site, generating plasmid pETS130:*PnrdR*(PAO1) $\Delta fleQ$ Box (see Material and Methods and Supplementary Table S1).

Figure 4A shows a decrease in *nrdR* expression under aerobic and anaerobic conditions compared to the wild-type promoter, both in the *fleQ* mutant background and when the FleQ binding site was mutated, corroborating the *nrdR* gene expression detected by RT-PCR. Complementation with a FleQ overexpression construct (pUCP20T:P*fleQ*:*fleQ*) increased *nrdR* gene expression, restoring wild-type levels (see Figure 3A). These results confirm the direct activation of *nrdR* expression via FleQ binding under planktonic conditions.

We found that transcriptional fusion studies yielded similar results anaerobically to those obtained under aerobic conditions (see Figure 4B).

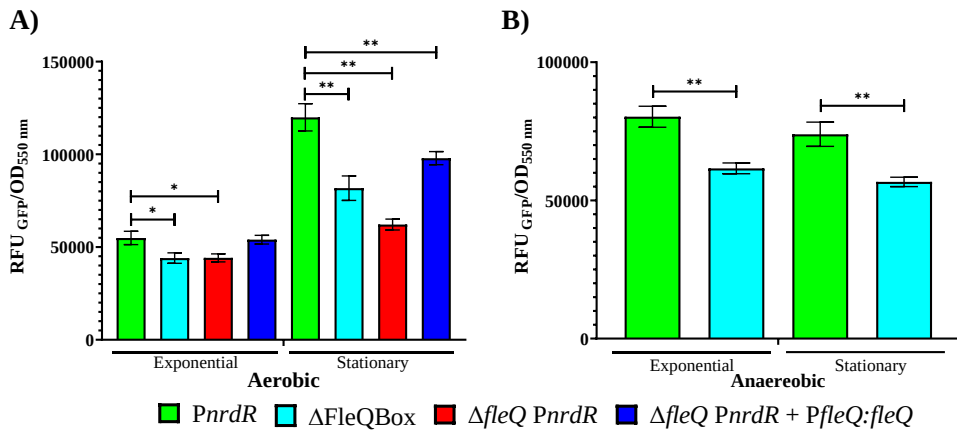


Figure 4. Aerobic and anaerobic *nrdR* gene expression. A) Aerobic *P. aeruginosa* PAO1 exponential (OD₅₅₀ 0.45) and stationary (OD₅₅₀ >2.5) gene reporter assay of transcriptional fusions between *PnrdR* promoter [pETS130:*PnrdR*(PAO1), green] and *PnrdR* Δ FleQBox [pETS130:*PnrdR*(PAO1) Δ FleQBox, cyan blue]. The *P. aeruginosa* PAO1 Δ *fleQ* strain [pETS130:*PnrdR*(PAO1)] and its complemented strain [pUCP20T:P*fleQ*:*fleQ*] are represented in red and dark blue, respectively. B) Anaerobic *P. aeruginosa* PAO1 WT exponential (OD₅₅₀ 0.45) and stationary (OD₅₅₀ >2.5) gene reporter assay of transcriptional fusions between *PnrdR* promoter and *PnrdR* Δ FleQBox. The means of three independent experiments are displayed, and the error bars represent the positive standard deviation. Statistical analysis was performed using Student's unpaired *t*-test (*, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01).

c-di-GMP modulates the *FleQ* transcriptional regulation of the *nrdR* gene.

As previously mentioned, *FleQ* is closely related to biofilm development in *P. aeruginosa* by regulating the transition from planktonic to biofilm states. Its function is usually linked to intracellular *c*-di-GMP levels^{31–33}. To demonstrate the involvement of *FleQ*/*c*-di-GMP in the transcriptional regulation of the *nrdR* gene, we performed growth curves in combination with the addition of *c*-di-GMP during the exponential phase. We used the pETS130 promoter-probe plasmid carrying the *nrdR* [pETS130:*PnrdR*(PAO1)] and *pelA* [pETS130:*PpelA*(PAO1)] promoters, as well as the mutagenic *FleQ* box variants [pETS130:*PnrdR*(PAO1) Δ *FleQ*Box, pETS130:*PpelA*(PAO1) Δ *FleQ*Box1, pETS130:*PpelA*(PAO1) Δ *FleQ*Box2] (see Material and Methods). After 4.5 hours of initial growth, 0.1 mg/mL of *c*-di-GMP was added, and relative fluorescent units (RFU) were measured every 30 minutes (see Figure 5).

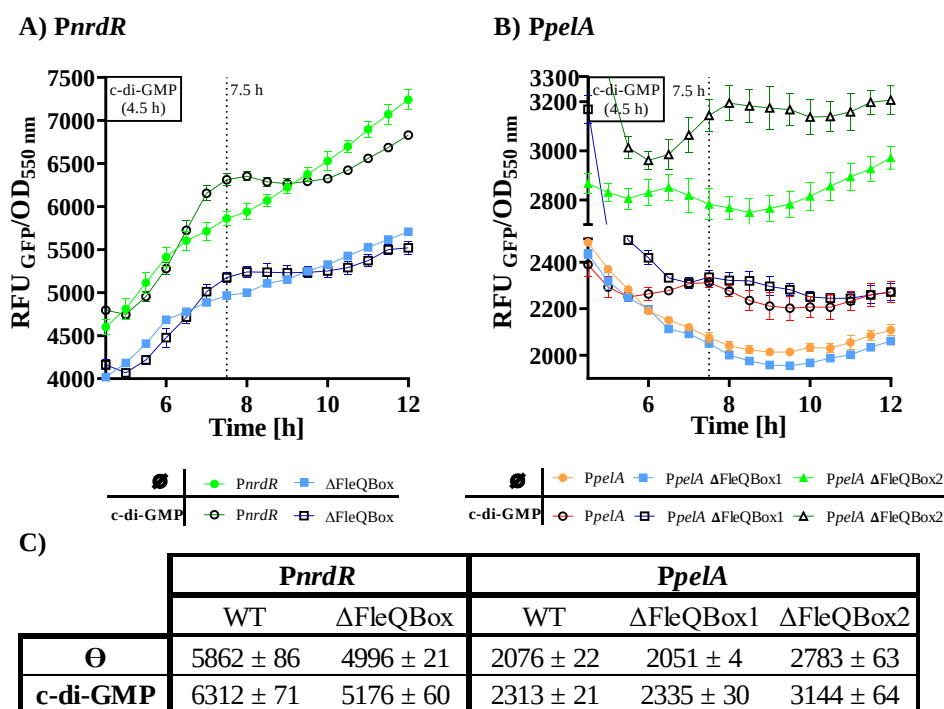


Figure 5. *FleQ* / *c*-di-GMP regulation of *nrdR*. A) Transcriptional analysis of *P. aeruginosa* PAO1 *PnrdR* promoter [pETS130:*PnrdR*(PAO1), green] and Δ *FleQ*Box [pETS130:*PnrdR*(PAO1) Δ *FleQ*Box, blue] in the presence or absence of 0.1 mg/mL *c*-di-GMP. B) Transcriptional analysis of *PpelA* promoter [pETS130:*PpelA*(PAO1),

orange], *PpelA* Δ FleQBox1 [pETS130:*PpelA*(PAO1) Δ FleQBox1, blue] and *PpelA* Δ FleQBox2 [pETS130:*PpelA*(PAO1) Δ FleQBox2, green] in the presence or absence of 0.1 mg/mL c-di-GMP. C) Value obtained at 4.5 h after inoculum. The means of three independent experiments are displayed, with error bars representing the positive standard deviation.

We observed that the c-di-GMP effect on *nrdR* and *pelA* gene expression occurred 2-3.5 hours after its addition to the bacterial culture (7.5 h) (Figure 5A). It was noted that c-di-GMP significantly increased the expression levels of both genes when the FleQ boxes were mutated (Figure 5B). The increases in *nrdR* gene expression were not as high as those observed for the *pelA* gene (Figure C). These results suggest that the regulation of the *nrdR* gene by FleQ is partially dependent on the c-di-GMP molecule under these conditions, and other mechanisms might also be involved. Further studies are needed to elucidate the precise regulatory mechanisms involved.

NrdR regulation under biofilm-forming conditions.

To understand the expression of the *nrdR* gene associated with the biofilm formation in *P. aeruginosa* PAO1, we performed static and flow-continuous biofilm experiments (see Material and Methods). We observed that the expression of *nrdR* increased during the three-day static biofilm experiment when the FleQ box (*PnrdR* Δ FleQbox) was mutated (Figure 6A). The outcome from the flow-continuous biofilm experiment showed a similar pattern, with increased *nrdR* expression when the FleQ DNA binding site was mutated (see Figure 7A-B).

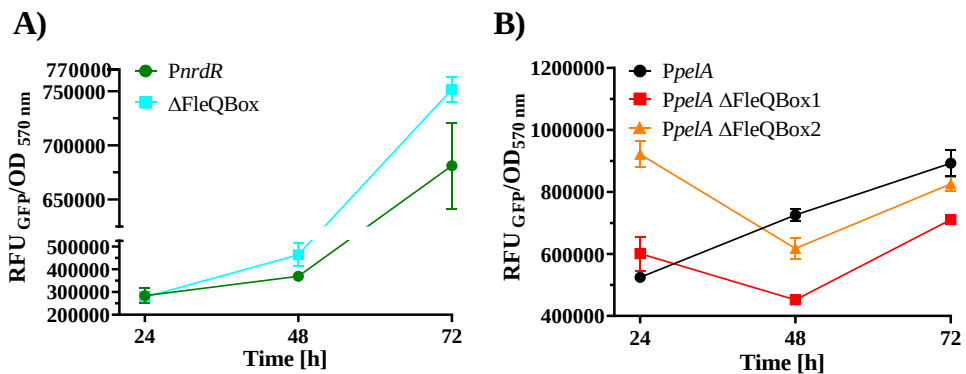


Figure 6. Static *nrdR* and *pelA* biofilm expression studies. A) Static biofilm of *P. aeruginosa* PAO1 measuring A) *nrdR* and B) *pelA* expression corrected by biomass (OD₅₇₀ at 24, 48, and 72 h). Gene expression was measured using green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene. *P. aeruginosa* PAO1 strains used: *PnrdR* [pETS130:*PnrdR*(PAO1), green], Δ FleQBox [pETS130:*PnrdR*(PAO1) Δ FleQBox, blue], *PpelA* promoter [pETS130:*PpelA*(PAO1), black], *PpelA* Δ FleQBox1 [pETS130:*PpelA*(PAO1) Δ FleQBox1, red] and *PpelA* Δ FleQBox2 [pETS130:*PpelA*(PAO1) Δ FleQBox2, orange].

The *pelA* gene was used as a positive control to confirm FleQ function (Figure 6B, 7C-D). In the static biofilm experiment, the expression of the wild-type *pelA* promoter at 72 h was similar to the expression of the *pelA* promoter with the FleQbox2 mutation (Δ FleQbox2), but higher than the expression of *pelA* with the FleQbox1 mutation in the promoter region (Figure 6B). The results from the flow-continuous biofilm experiment showed a similar pattern. The expression of wild-type *pelA* was identical to that of the strain with the FleQbox2 mutation but much higher than the expression of *pelA* with the FleQbox1 mutation in the promoter region (Figure 7D). These findings were further confirmed by CSLM images shown in Figure 7C.

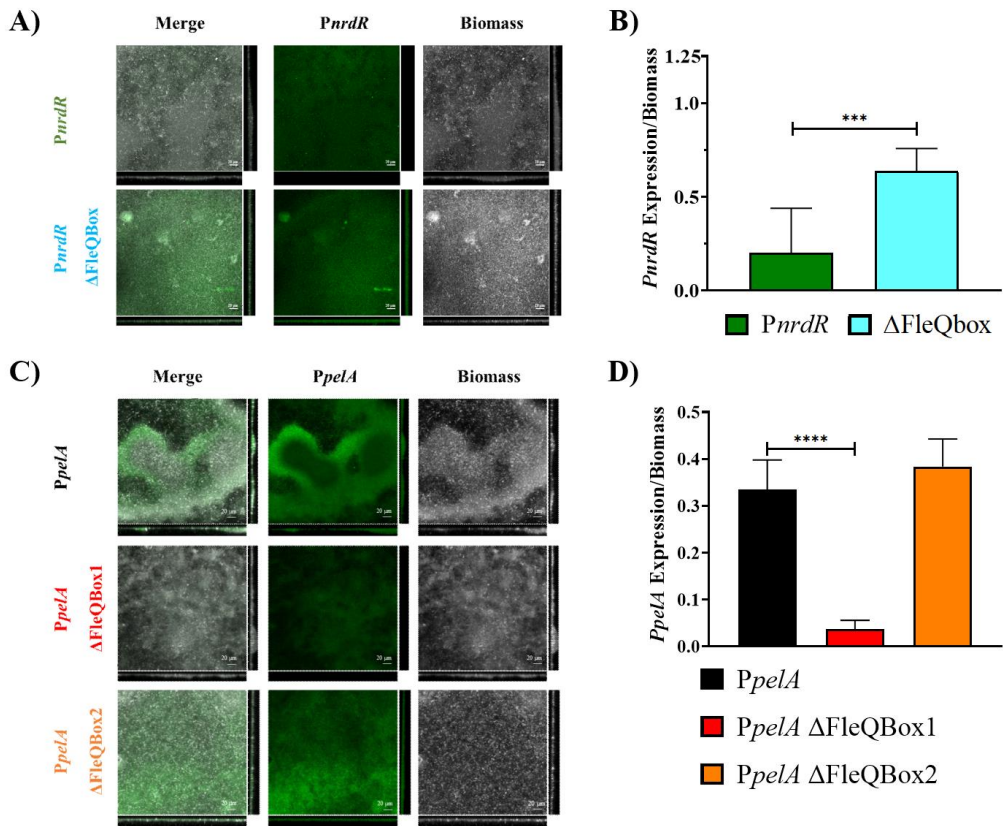


Figure 7. Continuous *nrdR* and *pelA* biofilm expression studies. A) CLSM images of *P. aeruginosa* PAO1 continuous biofilm showing *nrdR* expression with a wild-type promoter (*PnrdR*) and the FleQ box mutated (*PnrdR* Δ*FleQ*box). B) Mean and standard deviation of *nrdR* expression normalized by biomass in a continuous *P. aeruginosa* PAO1 biofilm. C) CLSM images of *P. aeruginosa* PAO1 continuous biofilm showing *pelA* expression with a wild-type promoter (*PpelA*), FleQ Box1 mutated (*PpelA* Δ*FleQ*Box1), and a FleQ Box2 mutated (*PpelA* Δ*FleQ*Box2). D) Mean and standard deviation of *pelA* expression normalized by biomass in a continuous *P. aeruginosa* PAO1 biofilm. The continuous-flow biofilm was stained with SYTO60 (grey) and GFP is shown in green. Statistical analysis was performed using Student's unpaired *t*-test (***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$). *P. aeruginosa* PAO1 strains used: *PnrdR* [pETS130:*PnrdR*(PAO1), green], Δ*FleQ*Box [pETS130:*PnrdR*(PAO1) Δ*FleQ*Box, blue], *PpelA* promoter [pETS130:*PpelA*(PAO1), black], *PpelA* Δ*FleQ*Box1 [pETS130:*PpelA*(PAO1) Δ*FleQ*Box1, red] and *PpelA* Δ*FleQ*Box2 [pETS130:*PpelA*(PAO1) Δ*FleQ*Box2, orange] Scale bars correspond to 20 μm.

NrdR expression under infection

Galleria mellonella is an alternative animal model of infection. The similarities between its innate immune system and that of mammals, along with other advantages, make these larvae a useful and popular infection model. Previous studies have reported the use of *G. mellonella* larvae for monitoring gene expression during bacterial infection^{19,29}. Here, we aimed to understand *nrdR* regulation by injecting *P. aeruginosa* PAO1 containing the different promoter constructs fused to the *luxCDABE* genes, using the pETS220-BIATlux:*PnrdR* plasmids (see Material and Methods). This allowed the measurement of relative bioluminescence (RL) from the larvae at both 15 and 18 hours post-infection, comparing the induction of the *nrdR* promoters with their mutagenic variants in the FleQ binding site.

As seen in Figure 8, the wild-type *PnrdR* construction showed a 75.2 fold-change induction (at 18 h compared to 15 h), which decreased when the Δ FleQ box was mutated (44.2 fold-change). The FleQ box clearly regulates *nrdR*, as its expression is significantly reduced when this binding region is removed. A fragment of the *anr* gene (similar in size to the promoters used) was inserted into the vector using the MCS, so the *anr* mock construction (pETS220-BIATlux:*anr*) was used as a negative control.

We used a Δ *fleQ* strain and the corresponding mutation complementation plasmid to ensure that the effect observed when the FleQ box mutation was introduced into the *PnrdR* was similar, and we obtained almost the same levels as the WT strain (see Supplementary Figure S5).

Bioluminescence was also checked directly from the larvae individually using an ImageQuant LAS 4000, and the expression pattern obtained with the Microplate Reader was corroborated (see Figure 8A).

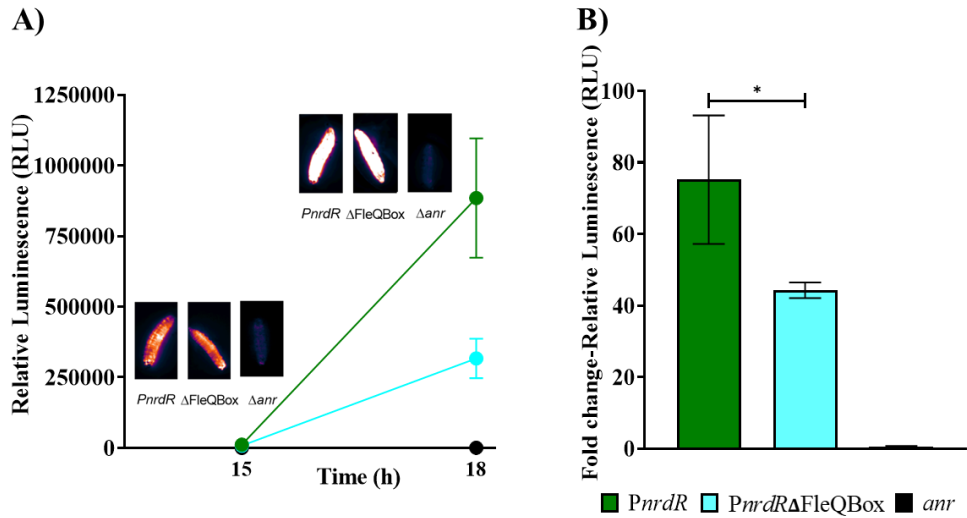


Figure 8. *nrdR* expression during *G. mellonella* larvae infection. A) *Pnrdr-lux* expression in a *G. mellonella* infection with *P. aeruginosa* PAO1 WT and with the mutated FleQ binding site strains after 15 and 18 hours. Images of infected larvae were taken at 15 h and 18 h post-infection and visualized using the Gem lookup table from ImageJ Fiji. B) *nrdR* expression fold change of *P. aeruginosa* PAO1 WT strain during infection in *G. mellonella*. *P. aeruginosa* PAO1 strains used: *Pnrdr* [pETS220-BIATlux:*Pnrdr*, green], Δ FleQBox [pETS220-BIATlux:*Pnrdr* Δ FleQBox, blue] and *anr* [pETS220-BIATlux:*anr*, black]. The means of three independent experiments are displayed, and the error bars represent the positive standard deviation. Statistical analysis was performed using Student's unpaired *t*-test (*, $p < 0.05$).

Discussion

The medical relevance of *P. aeruginosa* has been increasing in recent years, particularly due to its association with nosocomial infections and chronic infections like cystic fibrosis and other bronchiectasis^{34–36}. This is primarily attributed to its remarkable adaptability to different environments, driven by its genetic diversity. *P. aeruginosa* possesses a range of abilities that confer advantages for growth under diverse environmental conditions, including the ability to thrive in both aerobic and anaerobic environments with different oxygen concentrations^{37,38}, as well as under biofilm-forming conditions³⁹ or in infections of plants, animals and humans⁴⁰.

In this study, we focused on NrdR, a transcriptional regulator involved in the control of all three classes of RNRs encoded in *P. aeruginosa*¹². Although NrdR was first identified in *S. coelicolor*⁴¹ and later in *E. coli*¹³, mycobacteria⁴² and *P. aeruginosa*⁴³, its regulation remains poorly understood. Previous work from our group identified NarL as a transcriptional regulator of the *nrdR* gene under anaerobic conditions¹². In this study, our goal was to unravel the transcriptional regulation of *nrdR* and identify possible transcription factors that modulate its expression under aerobic and anaerobic conditions, during biofilm formation, and in the *G. mellonella* infection model.

First, we determined the transcription start site (TSS) of the *nrdR* gene using the 5' RACE technique, locating it at the -28 bp position (Figure 1). This finding was corroborated by other transcriptomic studies of *P. aeruginosa* under aerobic and anaerobic conditions³⁰.

Second, we used bioinformatics to identify potential transcription factor binding sites that could regulate *nrdR*. We detected seven putative transcription factor binding sites in the *nrdR* promoter region (Figure 1). The quorum sensing (QS) putative boxes were excluded from further consideration, as no changes in *nrdR* transcription were observed in isogenic QS mutants (Supplementary Figure S3). Regarding the two NarL boxes, our group experimentally confirmed their presence and importance in regulating this gene under anaerobic conditions¹². Finally, we identified a FleQ binding site as a novel regulator of *nrdR*, which became the focus of this study. Although the FleQ box was located far from the predicted TSS (around 253 pb), other studies have demonstrated that FleQ-regulated genes, such as *fleSR*, can be regulated via looping^{33,44}. Additionally, two FleQ binding sites have been identified at -294 and -263 bp relative to the translation start site of the PA2440 gene⁴⁵, supporting the feasibility of FleQ's role in regulating the *nrdR* transcription.

To validate our bioinformatic predictions, we attempted EMSA to confirm the direct binding of the identified transcriptional factors to the *nrdR* promoter. However, we were unable to produce soluble FleQ despite various solubilization attempts. Therefore, we employed an alternative pull-down assay using tandem repeats of the *nrdR* promoter, crude extract from *P. aeruginosa* PAO1, and magnetic beads (see Materials and Methods and Supplementary Figure S1). This approach, coupled with LC-MS proteomic analysis, successfully confirmed the direct binding of FleQ and NarL to the *nrdR* promoter region. Additionally, our results provided significant insights by identifying other potential regulatory proteins from the UniProt database's Master Protein (MP) list, offering a valuable resource for future investigations into the complex mechanisms governing *nrdR* gene expression.

During the exponential growth phase, ribonucleotide reductase (RNR) is crucial for synthesizing deoxyribonucleotides, which are essential for DNA repair and synthesis. Given the importance of this process, its regulation is tightly controlled. Previous studies have established NrdR's involvement in this regulation^{12,13,17,18,46,47}.

We demonstrate that FleQ actively regulates *nrdR* under planktonic conditions. Figure 3-4 illustrate FleQ transcriptional regulation of *nrdR* under both aerobic and anaerobic environments. Initially, we investigated whether *fleQ* depletion affected the global gene expression of *P. aeruginosa* PAO1 WT (Figure 3). To this end, we compared the growth curves of *P. aeruginosa* PAO1 WT and Δ *fleQ* strains under aerobic and anaerobic conditions. The Δ *fleQ* strain exhibited slower growth rates under anaerobic conditions, suggesting FleQ's involvement in regulating genes essential for anaerobic growth, similar to its role in denitrification activation in *Pseudomonas fluorescens*⁴⁸. RT-qPCR analysis revealed the downregulation of *nrdR* mRNA in the *P. aeruginosa* PAO1 Δ *fleQ* strain (Figure 3B). Subsequently, we performed FleQ-binding experiments using *P. aeruginosa* PAO1 WT and PAO1 Δ *fleQ* strains in combination with promoter-probe plasmids containing transcriptional fusions of *nrdR* and mutated *nrdR*/ Δ FleQBox promoters. Additionally, *pelA* served as a control for FleQ's transcriptional regulation^{31,32}. Gene reporter assays during planktonic growth indicated that FleQ functions as an activator (Figure 4), consistent with its role in regulating flagellar synthesis genes⁴⁹. Mutagenesis of the FleQ box within the *nrdR* gene consistently led to downregulation regardless of conditions, an effect reversed by complementing the Δ *fleQ* strain with the wild-type *nrdR* gene. These findings establish FleQ's direct role in *nrdR* gene expression, corroborating the RT-qPCR results.

However, FleQ's regulatory behavior varied depending on intracellular c-di-GMP levels³¹. While c-di-GMP is recognized as a second messenger regulating virulence

and biofilm formation in bacteria⁵⁰, it also modulates FleQ activity^{31–33}. To investigate whether *nrdR* regulation was influenced by the FleQ/c-di-GMP interaction under biofilm-forming conditions (high c-di-GMP levels)^{32,50}, we examined *nrdR* expression following exogenous c-di-GMP addition to liquid cultures (Figure 5). We observed enhanced *nrdR* expression under these conditions, although the effect was less pronounced than anticipated based on the more significant impact of c-di-GMP on *pelA* expression³¹. Therefore, we suspect that an additional FleQ binding site in the *PnrdR* promoter might explain the difference between the observed results.

FleQ's potential regulatory function on the *nrdR* gene is supported by its established role in the planktonic-to-biofilm transition mediated by intracellular c-di-GMP levels, characterized by the shift from flagellar to biofilm-associated gene activation⁴⁴. *nrdR* expression is intricately linked to the complex regulation of *P. aeruginosa* ribonucleotide reductases (RNRs)¹². The expression profiles of the different RNR classes (I, II, and III) exhibit dynamic changes throughout planktonic growth, becoming particularly pronounced during biofilm formation. Given FleQ's confirmed regulatory activity in these environments^{31–33,44}, it is highly plausible that it serves as a key regulator of *nrdR* expression under the experimental conditions investigated in this study (planktonic, biofilm and active infection).

To investigate *nrdR* gene expression *in vivo*, we conducted static and flow-continuous biofilm experiments with *P. aeruginosa* PAO1 WT (Figures 6-7) and an *in vivo* acute infection model using *G. mellonella* (Figure 8). However, a $\Delta fleQ$ strain was unsuitable for this study because it cannot form a mature biofilm³². We used the *PpelA* promoter as a positive control for our biofilm experiments, focusing on the second FleQ box due to its stronger gene expression response³¹.

In our biofilm experiments, *nrdR* gene expression exhibited a response opposite to that observed during planktonic growth, with FleQ acting as a repressor (Figures 4, 6-7). This is likely due to high c-di-GMP levels facilitating DNA looping, as observed in *fleSR* regulation⁴⁹. We observed progressively increasing *nrdR* gene expression during a three-day static biofilm, with a more pronounced effect using the mutagenic box variant (Figure 6). The flow-continuous biofilm experiment corroborated these findings (Figure 7), providing insights into chronic *P. aeruginosa* lung infections^{51,52}.

G. mellonella is a valuable model for studying bacterial pathogenesis^{19,53–56}, including RNR expression¹⁹, and its innate immune response mimics acute infection in mammals⁵⁷. However, the model has limitations when it comes to biofilm formation. The larval immune system, although less complex than that of mammals, still presents challenges for *P. aeruginosa* biofilm formation. Hemocytes, the immune

cells of the larvae, actively phagocytose and eliminate bacteria, making it difficult for *P. aeruginosa* to establish and maintain biofilms⁵⁸. Additionally, the short lifespan of infected larvae does not allow for mature biofilm development⁵⁹. Consequently, *nrdR* expression in *G. mellonella* more accurately reflects planktonic growth rather than biofilm conditions.

To assess the effect of *nrdR* gene expression during acute infection, we used modified *PnrdR*/FleQ box constructs in *G. mellonella* as a living acute infection model¹⁹. Our results showed that FleQ acts as an activator of *nrdR* at 18 hours post-infection (Figure 8), consistent with planktonic growth (Figures 4 and 8). This was confirmed by the significant downregulation of *nrdR* expression when the FleQ box was mutated (Figures 8). We also compared *nrdR* expression between the *P. aeruginosa* PAO wild-type strain and the PAO Δ *fleQ* strain to determine whether the complemented strain could restore normal *nrdR* expression levels. The infection of *G. mellonella* with the PAO1 Δ *fleQ* strain showed no difference in survivability compared to the WT strain (Supplementary Figure S5). However, complementation of the Δ *fleQ* strain restored WT levels of *nrdR* expression, confirming FleQ's role as a regulator of *nrdR* during infection.

Figure 9 summarizes the biological significance of FleQ's transcriptional regulation of *nrdR* expression in *P. aeruginosa*. Our findings suggest that FleQ regulates *nrdR* under various conditions, including planktonic growth, biofilm formation, and acute infection in the *G. mellonella* model, regardless of oxygen availability (Figure 4). This regulation is likely due to FleQ's role as a cellular state sensor, modulating by intracellular c-di-GMP levels^{32,33,44,60}, which are synthesized by diguanylate cyclases (DGCs) and degraded by phosphodiesterases (PDEs) (Figure 9).

Given the essential role of *nrdR*¹² and FleQ's pivotal function in the planktonic-to-biofilm transition^{44,60}, it is not surprising that these genes are closely linked. FleQ, in conjunction with c-di-GMP, modulates *nrdR* transcriptional, especially during mature biofilm formation (Figures 6-7) and the stationary phase (Figure 4) when *nrdR* is essential for repressing RNRs^{12,17,61}. Under low c-di-GMP conditions^{32,33,44,45,60}, FleQ acts as a master regulator in *P. aeruginosa*, activating flagellar genes (*flhA*, *flhE*, *fliL*, and *fleSR*)⁴⁹ during planktonic conditions while repressing biofilm-associated genes (Figure 9). FleQ is itself regulated by activators such as FleR (FleS/FleR two-component system)⁶² and repressors like Vfr⁶³ (Figure 9).

P. aeruginosa requires dispersal (flagellar genes) and exhaustive control of RNRs (regulated by NrdR, AlgR among others), as nucleotide synthesis is crucial for DNA repair and de novo synthesis⁶. Class Ia RNR is overexpressed during exponential growth, while classes II and III are repressed (Figure 9). Figures 3, 4, and 5 support

FleQ's role as a transcriptional activator of *pelA* and *nrdR* (Figure 9). We obtained the same results when infecting *G. mellonella*, and we think that's mainly because *P. aeruginosa* is unable to form a mature biofilm before the larva dies (Figure 8).

Within biofilms, bacterial gene expression profiles differ markedly from those in planktonic cells. Biofilm cells prioritize matrix production, driven by increased c-di-GMP levels through the activation of two-component systems like FleS/FleR⁶² and FimS/AlgR^{29,64} (Figure 9). This c-di-GMP is essential for FleQ-mediated biofilm synthesis through *psl* and *pel*⁴⁴ genes (Figure 9). Chronic infections with mature biofilms lead to the repression of toxin secretion, virulence, and metal acquisition⁶⁵. FleQ, in conjunction with c-di-GMP, contributes to this repression by downregulating the H1-T6SS^{49,62} (Figure 9).

Our study demonstrates that FleQ acts as a repressor of *nrdR* in biofilms (Figures 6-7, 9), consistent with the reduced DNA synthesis and repair observed in biofilm cells, which maintain a relatively low metabolic state to evade the host immune system⁶⁶⁻⁶⁸. This repression may help prevent a state similar to exponential growth or acute infection (Figure 6, 7), where high nucleotide synthesis is required. Previous work from our group has shown that NarL acts as an activator of *nrdR* in biofilms¹², indicating a complex regulatory network. We believe that FleQ's regulation of *nrdR* is similar to its regulation of the *pelA* gene (Figures 6-7), where FleQ's role has been demonstrated under both planktonic and biofilm growth conditions^{44,60}.

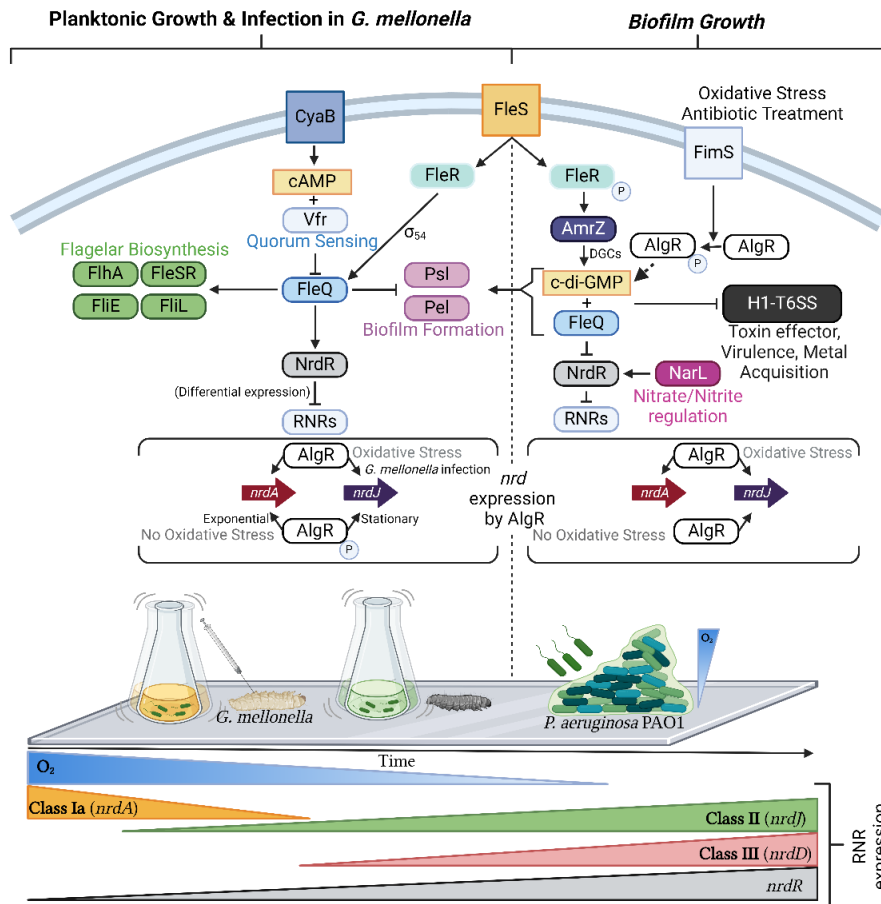


Figure 9. Graphical representation of *nrdR*/FleQ regulation pathway in *P. aeruginosa* PAO1 and *G. mellonella*^{12,32,44,62,64,69}. The regulation pathway is depicted under planktonic growth and during *G. mellonella* infection. FleQ serves as an activator for both *nrdR* and flagellar biosynthesis genes (e.g. *flhA*, *flhE*, *flhL*, etc.), while simultaneously repressing biofilm formation genes (*psl*, *pel*, etc.). FleQ itself is regulated by quorum-sensing (QS) proteins such as Vfr or FleR. During biofilm formation, FleQ and NarL act as repressor of *nrdR*. In these conditions, FleQ regulation is dependent on the concentration of c-di-GMP, which is elevated due to the upregulation of diguanylate cyclase (DGC) by AmrZ and oxidative stress signal (FimS-AlgR). The regulation of *nrdA* and *nrdJ* by AlgR is highlighted in boxes sections. At the bottom of the image, the expression levels of RNRs and the fold-change in *nrdR* gene expression over time are represented. The image was created using BioRender.com.

Thanks to this study, we are now a step closer to understanding the regulation of the *nrdR* gene in *P. aeruginosa* PAO1 (Figure 9). We identified new putative TFs involved in this process through pull-down assays and demonstrated that FleQ is a key regulator of *nrdR*, acting as an activator under planktonic growth conditions and during *G. mellonella* infection, and as a repressor biofilm-promoting conditions. Oxygen concentration variations did not significantly affect this regulation, likely due to the critical function of *nrdR* under these conditions, as demonstrated in previous research¹².

Acknowledgements

This study was partially supported by grants PID2021-125801OB-I00, PLEC2022-009356 and PDC2022-133577-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and “ERDF A way of making Europe”, the CERCA programme and AGAUR-Generalitat de Catalunya (2021SGR01545), the European Regional Development Fund (FEDER) and Catalan Cystic Fibrosis association. DM and JA are supported with an FI grant from the Generalitat de Catalunya (2020-FI-B-00175 and 2021-FI-B-00118).

References

1. Hewer, S. C. L. *et al.* Intravenous versus oral antibiotics for eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis (TORPEDO-CF): a randomised controlled trial. *Lancet Respir Med* **8**, 975–986 (2020).
2. Crespo, A., Gavalda, J., Julián, E. & Torrents, E. A single point mutation in class III ribonucleotide reductase promoter renders *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inefficient for anaerobic growth and infection OPEN. doi:10.1038/s41598-017-14051-2.
3. Sambrano, H. *et al.* Prevalence of antibiotic resistance and virulent factors in nosocomial clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Panamá. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* **25**, 101038 (2021).
4. Reig, S., Le Gouellec, A. & Bleves, S. What Is New in the Anti-*Pseudomonas aeruginosa* Clinical Development Pipeline Since the 2017 WHO Alert? *Front Cell Infect Microbiol* **12**, 1 (2022).
5. Tabor, D. E. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* PcrV and Psl, the Molecular Targets of Bispecific Antibody MEDI3902, Are Conserved Among Diverse Global Clinical Isolates. *J Infect Dis* **218**, 1983–1994 (2018).
6. Torrents, E. Ribonucleotide reductases: Essential enzymes for bacterial life. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 89098 (2014).
7. Torrents, E., Sahlin, M. & Sjöberg, B.-M. The Ribonucleotide Reductase Family : Genetics and Genomics. (2008).
8. Nordlund, P. & Reichard, P. Ribonucleotide Reductases. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142443> **75**, 681–706 (2006).
9. Reichard, P. Ribonucleotide Reductases: The Evolution of Allosteric Regulation. *Arch Biochem Biophys* **397**, 149–155 (2002).
10. Greene, B. L. *et al.* Ribonucleotide Reductases: Structure, Chemistry, and Metabolism Suggest New Therapeutic Targets. *Annu Rev Biochem* **89**, 45–75 (2020).
11. Hofer, A., Crona, M., Logan, D. T. & Sjöberg, B. M. DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **47**, 50–63 (2012).
12. Crespo, A., Pedraz, L. & Torrents, E. Function of the *Pseudomonas aeruginosa* NrdR Transcription Factor: Global Transcriptomic Analysis and Its Role on Ribonucleotide Reductase Gene Expression. *PLoS One* **10**, e0123571 (2015).

13. Torrents, E. *et al.* NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *J Bacteriol* **189**, 5012–5021 (2007).
14. Borovok, I. *et al.* *Streptomyces spp.* contain class Ia and class II ribonucleotide reductases: Expression analysis of the genes in vegetative growth. *Microbiology (N Y)* **148**, 391–404 (2002).
15. Rodionov, D. A. & Gelfand, M. S. Identification of a bacterial regulatory system for ribonucleotide reductases by phylogenetic profiling. *Trends in Genetics* **21**, 385–389 (2005).
16. Borovok, I. *et al.* Alternative oxygen-dependent and oxygen-independent ribonucleotide reductases in *Streptomyces*: cross-regulation and physiological role in response to oxygen limitation. *Mol Microbiol* **54**, 1022–1035 (2004).
17. Rozman Grinberg, I. *et al.* A nucleotide-sensing oligomerization mechanism that controls NrdR-dependent transcription of ribonucleotide reductases. *Nature Communications* 2022 13:1 **13**, 1–10 (2022).
18. Mckethan, B. L. & Spiro, S. Cooperative and allosterically controlled nucleotide binding regulates the DNA binding activity of NrdR. *Mol Microbiol* **90**, 278–289 (2013).
19. Moya-Andérico, L., Admella, J., Fernandes, R. & Torrents, E. Monitoring Gene Expression during a *Galleria mellonella* Bacterial Infection. *Microorganisms* **8**, 1–14 (2020).
20. Chuanchuen, R., Narasaki, C. T. & Schweizer, H. P. Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. *Biotechniques* **33**, 760–763 (2002).
21. Eckweiler, D., Dudek, C. A., Hartlich, J., Brötje, D. & Jahn, D. PRODORIC2: the bacterial gene regulation database in 2018. *Nucleic Acids Res* **46**, D320–D326 (2018).
22. Urban, A., Neukirchen, S. & Jaeger, K. E. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res* **25**, 2227 (1997).
23. Sjöberg, B. M. & Torrents, E. Shift in ribonucleotide reductase gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* during infection. *Infect Immun* **79**, 2663–2669 (2011).
24. Crespo, A., Pedraz, L., Astola, J. & Torrents, E. *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Deficient Biofilm Formation in the Absence of Class II and III Ribonucleotide Reductases Due to Hindered Anaerobic Growth. (2016) doi:10.3389/fmicb.2016.00688.

25. Peeters, E., Nelis, H. J. & Coenye, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbiol Methods* **72**, 157–165 (2008).
26. Blanco-Cabra, N. *et al.* Characterization of different alginate lyases for dissolving *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Scientific Reports* 2020 10:1 **10**, 1–10 (2020).
27. Heydorn, A. *et al.* Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology (N Y)* **146**, 2395–2407 (2000).
28. Jutras, B. L., Verma, A. & Stevenson, B. Identification of Novel DNA-Binding Proteins Using DNA-Affinity Chromatography/Pull Down. *Curr Protoc Microbiol* **24**, 1F.1.1-1F.1.13 (2012).
29. Rubio-Canalejas, A., Admella, J., Pedraz, L. & Torrents, E. *Pseudomonas aeruginosa* Nonphosphorylated AlgR Induces Ribonucleotide Reductase Expression under Oxidative Stress Infectious Conditions. *mSystems* **8**, (2023).
30. Wurtzel, O. *et al.* The single-nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body temperature. *PLoS Pathog* **8**, (2012).
31. Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M. R. & Harwood, C. S. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res* **40**, 7207 (2012).
32. Hickman, J. W. & Harwood, C. S. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* **69**, 376 (2008).
33. Jyot, J., Dasgupta, N. & Ramphal, R. FleQ, the Major Flagellar Gene Regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, Binds to Enhancer Sites Located Either Upstream or Atypically Downstream of the RpoN Binding Site. *J Bacteriol* **184**, 5251 (2002).
34. Folkesson, A. *et al.* Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology* 2012 10:12 **10**, 841–851 (2012).
35. Da Silva Filho, L. V. R. F. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: scientific evidence regarding clinical impact, diagnosis, and treatment. *J Bras Pneumol* **39**, 495 (2013).
36. Winstanley, C., O'Brien, S. & Brockhurst, M. A. *Pseudomonas aeruginosa* Evolutionary Adaptation and Diversification in Cystic Fibrosis Chronic Lung Infections. *Trends Microbiol* **24**, 327–337 (2016).

37. Trunk, K. *et al.* Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ Microbiol* **12**, 1719–1733 (2010).
38. Arat, S., Bullerjahn, G. S. & Laubenbacher, R. A Network Biology Approach to Denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. (2015) doi:10.1371/journal.pone.0118235.
39. Werner, E. *et al.* Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6188–6196 (2004).
40. Diggle, S. P. & Whiteley, M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (N Y)* **166**, 30 (2020).
41. Grinberg, I. *et al.* The *Streptomyces* NrdR transcriptional regulator is a Zn ribbon/ATP cone protein that binds to the promoter regions of class Ia and class II ribonucleotide reductase operons. *J Bacteriol* **188**, 7635–7644 (2006).
42. Mowa, M. B., Warner, D. F., Kaplan, G., Kana, B. D. & Mizrahi, V. Function and Regulation of Class I Ribonucleotide Reductase-Encoding Genes in Mycobacteria. *J Bacteriol* **191**, 985 (2009).
43. Torrents, E., Poplawski, A. & Sjöberg, B.-M. Two Proteins Mediate Class II Ribonucleotide Reductase Activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 16571–16578 (2005).
44. Oladosu, V. I., Park, S. & Sauer, K. Flip the switch: the role of FleQ in modulating the transition between the free-living and sessile mode of growth in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* (2024) doi:10.1128/JB.00365-23.
45. Baraquet, C. & Harwood, C. S. FleQ DNA binding consensus sequence revealed by studies of FleQ-dependent regulation of biofilm gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **198**, 178–186 (2016).
46. Rozman Grinberg, I. *et al.* A nucleotide-sensing oligomerization mechanism that controls NrdR-dependent transcription of ribonucleotide reductases. *Nature Communications* 2022 13:1 **13**, 1–10 (2022).
47. Naveen, V. & Hsiao, C. D. NrdR Transcription Regulation: Global Proteome Analysis and Its Role in *Escherichia coli* Viability and Virulence. *PLoS One* **11**, (2016).
48. Blanco-Romero, E. *et al.* Transcriptomic analysis of *Pseudomonas ogarae* F113 reveals the antagonistic roles of AmrZ and FleQ during rhizosphere adaption. *Microb Genom* **8**, 750 (2022).

49. Shao, X. *et al.* The transcriptional regulators of virulence for *Pseudomonas aeruginosa*: Therapeutic opportunity and preventive potential of its clinical infections. *Genes Dis* **10**, 2049–2063 (2022).
50. Cotter, P. A. & Stibitz, S. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* **10**, 17–23 (2007).
51. Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O. & Beloin, C. From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens* **2**, 288–356 (2013).
52. Nielsen, M. W., Sternberg, C., Molin, S. & Regenberg, B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in flow cells. *J Vis Exp* (2011) doi:10.3791/2383.
53. Seed, K. D. & Dennis, J. J. Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* complex. *Infect Immun* **76**, 1267–1275 (2008).
54. Harding, C. R. *et al.* *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model. *Infect Immun* **80**, 2780–2790 (2012).
55. Admella, J. & Torrents, E. Investigating bacterial infections in *Galleria mellonella* larvae: Insights into pathogen dissemination and behavior. *J Invertebr Pathol* **200**, 107975 (2023).
56. Peleg, A. Y. *et al.* *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2605–2609 (2009).
57. Moya-Andérico, L. *et al.* Utility of *Galleria mellonella* larvae for evaluating nanoparticle toxicology. *Chemosphere* **266**, 129235 (2021).
58. Admella, J. & Torrents, E. A Straightforward Method for the Isolation and Cultivation of *Galleria mellonella* Hemocytes. *Int J Mol Sci* **23**, (2022).
59. Hill, L., Veli, N. & Coote, P. J. Evaluation of *Galleria mellonella* larvae for measuring the efficacy and pharmacokinetics of antibiotic therapies against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Int J Antimicrob Agents* **43**, 254–261 (2014).
60. Arora, S. K., Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S. & Ramphal, R. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J Bacteriol* **179**, 5574–5581 (1997).
61. Naveen, V. & Hsiao, C. D. NrdR Transcription Regulation: Global Proteome Analysis and Its Role in *Escherichia coli* Viability and Virulence. *PLoS One* **11**, (2016).

62. Zhou, T. *et al.* The Two-Component System FleS/FleR Represses H1-T6SS via Cyclic di-GMP Signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **88**, (2022).
63. Dasgupta, N., Ferrell, E. P., Kanack, K. J., West, S. E. H. & Ramphal, R. *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is $\sigma 70$ dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* **184**, 5240–5250 (2002).
64. Crespo, A., Pedraz, L., Van Der Hofstadt, M., Gomila, G. & Torrents, E. Regulation of ribonucleotide synthesis by the *Pseudomonas aeruginosa* two-component system AlgR in response to oxidative stress. *Scientific Reports* 2017 7:1 **7**, 1–15 (2017).
65. Qin, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1 **7**, 1–27 (2022).
66. Thöming, J. G. & Häussler, S. *Pseudomonas aeruginosa* Is More Tolerant Under Biofilm Than Under Planktonic Growth Conditions: A Multi-Isolate Survey. *Front Cell Infect Microbiol* **12**, 1 (2022).
67. Spoering, A. L. & Lewis, K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* **183**, 6746–6751 (2001).
68. Shree, P., Singh, C. K., Sodhi, K. K., Surya, J. N. & Singh, D. K. Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. *Medicine in Microecology* **16**, 100084 (2023).
69. Chang, C. Y. Surface sensing for biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* **8**, 294514 (2018).

Supplementary Material

FleQ controls gene expression of *nrdR*, the master regulator of ribonucleotide reductases in *Pseudomonas aeruginosa*.

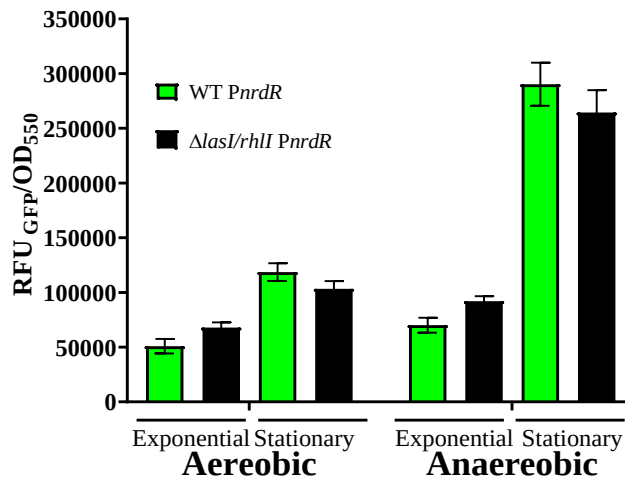
Domingo Marchan¹, Alba Rubio¹, José María Hernández², Joana Admella¹, Eduard Torrents^{1,3*}

¹Bacterial Infections: Antimicrobial Therapies, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain.

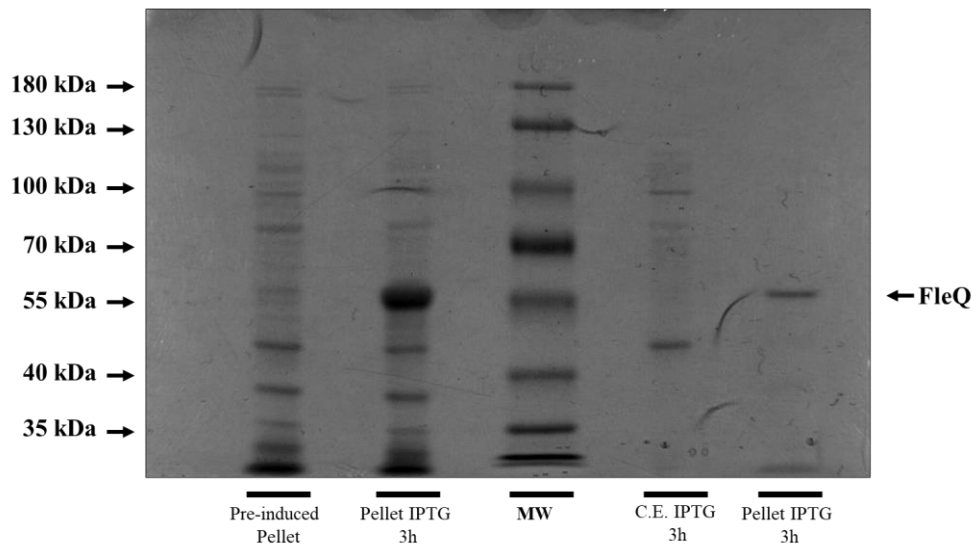
²Proteomics and Metabolomics Core Facility, Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain.

³Microbiology Section, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, 643 Diagonal Ave., 08028, Barcelona, Spain.

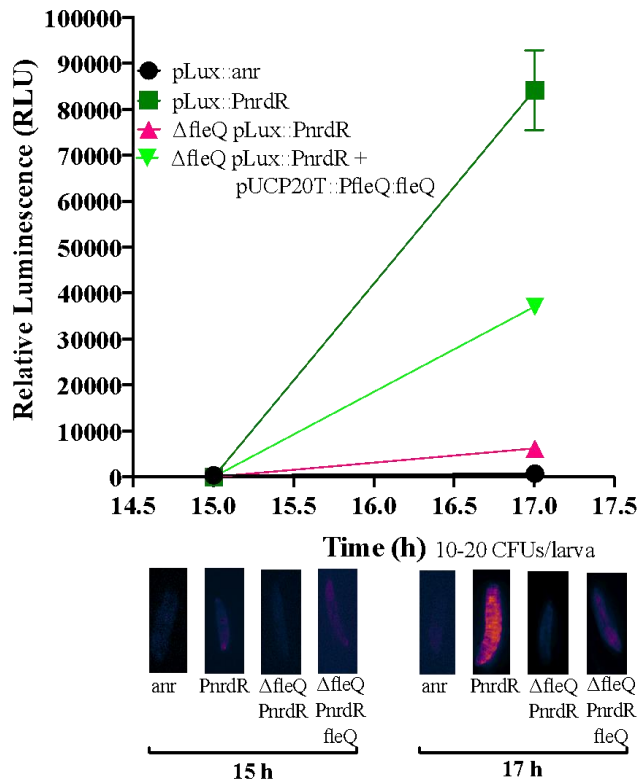
*Corresponding author; Eduard Torrents, e-mail: etorrents@ibecbarcelona.eu.



Supplementary Figure S3. Aerobic and anaerobic *nrdR/lasI/rhlI* gene reporter assays. Aerobic and anaerobic PAO1 WT exponential (OD₅₅₀ 0.45) and stationary (OD₅₅₀ >2.5) gene reporter assay of transcriptional fusions of *PnrdR* promoter in PAO1 WT and PAO1 $\Delta lasI/rhlI$ mutant strain. All transcriptional fusions between promoters are with a green fluorescent protein (GFP) as a reporter gene. No statistical differences were observed in a student's unpaired *t*-test.



Supplementary Figure S4. SDS-PAGE gel of *P. aeruginosa* PAO1 FleQ protein overproduction in *E. coli* BL21 (DE3). *E. coli* BL21(DE3) transformants with pET28a:*fleQ* cultured at 37 °C (lanes 1-2, 4-5) were subjected to electrophoresis on a 7.5% SDS-PAGE gel (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel- BioRad) and Coomassie-stained. Lane 1 (Pre-induced Pellet), whole cell extract without IPTG induction; lane 2 (Pellet IPTG 3 h), insoluble fraction after lysis of the cells; lane 3 (MW), Precision PLUS TM All Blue Prestained Protein Standards (BioRad); lane 4 (C.E. IPTG 3h), cell extract with IPTG induction; lane 5 (Pellet IPTG 3h), insoluble fraction after lysis of the cells.



Supplementary Figure S5. Bioluminescence *nrdR* studies in *G. mellonella* larvae using a PAO1 Δ *fleQ* strain. *PnrdR-lux* expression in a *Galleria mellonella* infection with *P. aeruginosa* PAO1 Δ *fleQ* strain after 15 and 17 hours. Images of infected larvae were taken at 15h and 17h post-infection and visualized using the Gem lookup table from ImageJ Fiji.

Supplementary Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Plasmids are listed with simplified names (referred to as...), which are used in the text. For strains, a detailed genotype description is also provided. References to the sources of plasmids and strains are provided here, for convenience of the reader. Abbreviations are used as follows: Amp^R/Cb^R, Cm^R, Gm^R, Km^R: resistances to ampicillin/carbenicillin, chloramphenicol, gentamycin and kanamycin. ATCC, CECT: American and Spanish Type Culture Collections. Stock: Laboratory stock strain. ThermoF: ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA.

Name	Reference name	Description	Source
Strains			
<i>E. coli</i> DH5a	DH5a	<i>recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR Φ80dlacZM15 F-ompT hsdS (rB-mB-) dcm+Tetr galλ</i>	Laboratory
BL21(DE3)	BL21(DE3)	(DE3) <i>endA Hte [argU proL Camr] [argU ileY leuW Strep/Spectr]</i>	ThermoFisher Scientific
PAO1	PAO1 WT	Wild-type (ATCC 15692 / CECT 4122) - Spanish Type Culture Collection	Laboratory
PW2981	PAO1 <i>ΔfleQ</i>	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>fleQ</i> mutant strain (HeQ-G06::ISphoA/hah)	PAO1 transposon mutant library (Jacobs et al., 2003)
PW7855	PAO1 <i>ΔnrdR</i>	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>nrdR</i> mutant strain (<i>nrdR</i> ::ISlacZ/hah, TcR)	PAO1 transposon mutant library (Jacobs et al., 2003)
PAO1 <i>ΔlasIΔrhlI</i>	PAO1 <i>ΔlasI/rhlI</i>	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 <i>lasI/rhlI</i> mutant strain	(Toyofuku et al., 2007)
Plasmids			
		Reference	
pETS130-GFP	pETS130 pETS130: <i>PnrdR</i> (PAO1)	<i>PnrdR</i>	Broad-host-range, replicative plasmid; Gm ^R (Sjöberg & Torrents, 2011)
	pETS130: <i>PnrdR</i> (PAO1) Δ <i>FleQ</i> Box	Δ <i>FleQ</i> Box	pETS130 derivative carrying <i>nrdR</i> promoter, Gm ^R This Work
	pETS130: <i>PnrdR</i> (PAO1) Δ <i>NarL</i> Box1&2		pETS130 derivative carrying <i>nrdR</i> promoter, Gm ^R mutation in <i>nrdR</i> promoter, Gm ^R This Work
	pETS130: <i>PpelA</i> (PAO1)	<i>PpelA</i>	pETS130 derivative carrying <i>pelA</i> promoter, Gm ^R This Work
	pETS130: <i>PpelA</i> (PAO1) Δ <i>FleQ</i> Box1	<i>PpelA</i> Δ <i>FleQ</i> Box1	pETS130 derivative carrying <i>FleQ</i> box1 mutation in <i>pelA</i> promoter, Gm ^R This Work
	pETS130: <i>PpelA</i> (PAO1) Δ <i>FleQ</i> Box2	<i>PpelA</i> Δ <i>FleQ</i> Box2	pETS130 derivative carrying <i>FleQ</i> box 2 mutation in <i>pelA</i> promoter, Gm ^R This Work
pUCP20T	pUCP20T		Broad-host-range, replicative plasmid; Amp ^R (West et al., 1994)
	pUCP20T: <i>Pflegq:fleq</i>	<i>Pflegq:fleq</i>	pUCP20T replicative plasmid carrying <i>fleQ</i> promoter and <i>fleQ</i> gene, Amp ^R This Work
pMX- <i>PnrdR</i> (PAO1)x3			Broad-host-range, replicative plasmid carrying <i>nrdR</i> promoter x3; Kn ^R ThermoFisher Scientific
pJET1.2	pJET		Commercial carrier plasmid, source for ampicillin/carbenicillin resistance (<i>bla</i>); Amp ^R ThermoFisher Scientific
pETS220-BIATlux	pETS220-BIATlux		Broad-host-range, promoterless <i>luxCDABE</i> ; Gm ^R (Moya-Andérico et al., 2020)
	pETS220-BIATlux: <i>PnrdR</i>	<i>lux:PnrdR</i>	pETS220-BIATlux derivative carrying <i>nrdR</i> promoter, Gm ^R This Work
	pETS220-BIATlux: <i>PnrdR</i> Δ <i>FleQ</i> Box	<i>lux:PnrdR</i> Δ <i>FleQ</i> Box	pETS220-BIATlux derivative carrying <i>FleQ</i> box1 mutation in <i>nrdR</i> promoter, Gm ^R This Work
	pETS220-BIATlux: <i>anr</i>	<i>anr</i>	pETS220-BIATlux derivative carrying <i>anr</i> gene fragment, Gm ^R (Moya-Andérico et al., 2020)
pET28a	pET28a		Vector for His6-tagged protein overexpression; KnR ThermoFisher Scientific
	pET28a: <i>flegq</i>		pET28a derivative carrying <i>flegq</i> gene This Work

Crespo, A., Pedraz, L., & Torrents, E. (2015). Function of the *Pseudomonas aeruginosa* NrdR Transcription Factor: Global Transcriptomic Analysis and

- Its Role on Ribonucleotide Reductase Gene Expression. *PLOS ONE*, 10(4), e0123571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123571>
- Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., . . . Manoil, C. (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), 14339-14344. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.2036282100>
- Moya-Andérico, L., Admella, J., Gaspar Quiaios Fernandes, R., & Torrents, E. (2020). Monitoring Gene Expression during a *Galleria mellonella* Bacterial Infection. *Microorganisms*, 8, 1798. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111798>
- Sjöberg, B.-M., & Torrents, E. (2011). Shift in Ribonucleotide Reductase Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa* during Infection. *Infection and Immunity*, 79(7), 2663-2669. <https://doi.org/doi:10.1128/IAI.01212-10>
- Toyofuku, M., Nomura, N., Fujii, T., Takaya, N., Maseda, H., Sawada, I., . . . Uchiyama, H. (2007). Quorum Sensing Regulates Denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 189(13), 4969-4972. <https://doi.org/doi:10.1128/JB.00289-07>
- 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/https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90237-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90237-2)

Supplementary Table S2. Primers and probes used in this study. Restriction enzymes are underlined and mutagenic TF boxes are in red.

Number	Name	Sequence (5' → 3')	Application
1	M13 Fw	GTTGTAAACGACGGCCAGT	Cloning control, colony PCR
2	M13 Rv	CAGGAAACAGCTATGACC	Cloning control, colony PCR
3	pJET_Fw	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Cloning control, colony PCR
4	pJET_Fw_Biotin	(Biotin)-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	5'-Biotin adding primer.
5	pJET_Rv	AAGAACATCGATTTCATGGCAG	Cloning control, colony PCR
6	PnrDR_PAO1_BamHI_Fw	<u>AGGATCC</u> ATGGTCACGCTGCGC	NrdR promoter, <i>P. aeruginosa</i> PAO1
7	PnrDR_PAO1_ClaI_Rv	AAA <u>ATCGAT</u> ATGGTGTCTATGGCACCCGAG	NrdR promoter, <i>P. aeruginosa</i> PAO1
8	PnrDR_PAO1_mutFleQ_Fw	GGCTTCGGCT <u>CGATCGCAATG</u> CAAGCGGCGAGGAGA	FleQBox mutation NrdR promoter, <i>P. aeruginosa</i> PAO1
9	PnrDR_PAO1_mutFleQ_Rv	CTCGCCGCTT <u>GATTGCGATCG</u> AGCCGAAGCCTGCGC	FleQBox mutation NrdR promoter, <i>P. aeruginosa</i> PAO1
10	PnrDR_mut_NarLBox_1 y 2_Fw	CGCGGATGCG <u>CCCAATT</u> GCGGCTTCCTCAGCATAATTAGTATCAGCACCA	NarLBox mutation NrdR promoter, <i>P. aeruginosa</i> PAO1
11	PnrDR_mut_NarLBox_1 y 2_Rv	TGGTGCTGATACTAATTATGCTGAAGGAAGCCGC <u>AATTGGG</u> CGCATCCGCG	NarLBox mutation
12	PpelA_BamHI_PAO1_Fw	<u>AGGATCCG</u> TTCTCGCACGCAACTGA	PelA promoter, <i>P. aeruginosa</i> PAO1
13	PpelA_ClaI_PAO1_Rv	AAA <u>ATCGAT</u> ACTCGATGGGTCTGAAGGATGTTAC	PelA promoter, <i>P. aeruginosa</i> PAO1
14	PpelA_mutFleQBox1_BamHI_PAO1_Fw	AGGATCCGTGCGCCTAAAAA <u>GGTC</u> CAGTTTCCGCT	FleQBox1 mutation PelA promoter, <i>P. aeruginosa</i> PAO1
15	PpelA_mutFleQBox2_PAO1_Fw	TAGTCATTAGA <u>GGTC</u> CGTTAATCGCC	FleQBox2 mutation
16	PpelA_mutFleQBox2_PAO1_Rv	GGCGATTAAACG <u>GACCT</u> TCTAATGACTA	PelA promoter, <i>P. aeruginosa</i> PAO1 FleQBox2 mutation
17	FleQ_PAO1_NdeI_Fw	AGGCAGCTGATCCATATGTGGCGCGAAACC	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 FleQ overproduction
18	FleQ_PAO1_BamHI_Rv	CCCAAAGGATCCTCAATCATCCGACAGGTC	<i>P. aeruginosa</i> PAO1 FleQ overproduction
19	GreenQRT_PAO-nrdR_Fw	AACGCTTCACCACTTCGAG	RT-PCR
20	GreenQRT_PAO-nrdR_Rv	GCAGCTTGTCCTCGTCGAAC	RT-PCR
21	Green-QRT_PpelA_PAO1_Fw	CGCTTTGTGCGGCACT	RT-PCR
22	Green-QRT_PpelA_PAO1_Rv	CACCCAGTCGAACTGGGAAAG	RT-PCR
23	GreenQRT_PAO-gapA_Fw	CCTCCCATCGGATCGTCTC	RT-PCR
24	GreenQRT_PAO-gapA_Rv	GGTCATCAGGCCGTGCTC	RT-PCR
25	TSS_nrdR-2_Rv	CTGACCGGACGCTTCTCCAG	5'-RACE
26	TSS_nrdR-3	CATGACCAGCTCGGCGGTC	5'-RACE
27	PfleQ_PAO1_XbaI_Fw	GG <u>TCT</u> AGATCATGGCTTTGTGCCGTTAC	FleQ promoter-gene, <i>P. aeruginosa</i> PAO1
28	FleQ_PAO1_BamHI-Rv	CCCAAAGGATCCTCAATCATCCGACAGGTC	FleQ promoter-gene, <i>P. aeruginosa</i> PAO1

EXCEL document with pull-down results: <https://bit.ly/3B4yT1X>

QR Code:



Capítulo 2: Novel Fluorescent Reporter Vectors for Monitoring Bacterial Promoter Activity under different environmental condition

Domingo Marchan¹, Alba Rubio-Canalejas¹, Núria Blanco-Cabra^{1,2}, Eduard Torrents^{1,2*}

¹Bacterial Infections: Antimicrobial Therapies, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain.

²Microbiology Section, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, 643 Diagonal Ave., 08028, Barcelona, Spain.

*Corresponding author; Eduard Torrents, e-mail: etorrents@ibecbarcelona.eu / eduard.torrents@ub.edu.

Autoría:

Domingo es el primer autor, ya que participó activamente en el diseño, ejecución y análisis de todos los experimentos y fue responsable de la redacción del manuscrito. La Dra. Alba Rubio contribuyó a la optimización de la formación de los biofilms, mientras que la Dra. Núria Blanco-Cabra figura como segunda coautora, siendo la responsable de la revisión completa del manuscrito como parte de la supervisión del trabajo.

Abstract

Gene expression in microorganisms plays a crucial role in regulating bacterial processes in response to specific environmental conditions. Therefore, analyzing various parameters that influence bacterial phenotype offers a valuable approach to understanding these processes. Reporter genes, such as fluorescent proteins (FPs) have greatly facilitated the investigation of gene promoter activities and its regulation in both *in vivo* and *in vitro* models. Due to their non-invasive nature, FPs are widely employed in molecular biology for diverse research objectives.

Transcriptional fusions between a promoter of interest and FPs provide a reliable method for measuring gene expression, typically constructed within a plasmid. These constructs, referred to as promoter-probe vectors, require selection pressure for stability, often maintained through the use of antibiotic. However, integrating promoter-reporter fusions directly into the bacterial genome is generally preferred, as eliminates the need for antibiotic supplementation, thereby ensuring plasmid stability and avoiding potential interference. Two primary techniques used for integrating foreign DNA into the bacterial genome include homologous recombination with suicide vectors and the use of mobile elements like the Tn5 transposon system.

In this study, we designed and developed a new generation of promoter-probe and transposon-delivery vectors, named pETS-IBECGLOW, pBAM-IBECGLOW and pUCP20T-IBECGLOW. These vectors incorporate genes encoding different FPs under the control of three ribonucleotide reductase (RNR) promoter classes from *Pseudomonas aeruginosa*. These plasmids were specifically engineered to enhance promoter-dependent FP expression while minimizing non-specific background leakage, particularly under variable oxygenic conditions and during biofilm formation.

Introduction

All biological processes arise from gene expression, a tightly regulated mechanism influenced by environmental conditions. Therefore, studying changes in gene expression and their associated phenotypic outcomes is crucial to understanding the dynamics of life¹. Fluorescent proteins (FPs) serve as fundamental tools for non-invasive gene expression studies, both *in vivo* and *in vitro*. Today, a wide array of FPs covering the entire UV-visible light spectrum is available, with continuous improvements in their biochemical properties, brightness, and photostability^{2,3}.

The primary strategy for using FPs in gene expression studies involves plasmids. Gene promoters can be fused to FPs and cloned into replicative plasmids, creating *promoter-probe* vectors^{4,5} that facilitate measuring promoter activity under specific conditions. The origin of replication (*ori*) determines whether these vectors are hosts-specific or capable of functioning across a broad host range (BHR), either by utilizing multiple origins of replication or *ori*'s functional in diverse distant species⁶. While replicative promoter-probe vectors are favoured for their ease of use and versatility, they present notable drawbacks. Since plasmids exist in multiple copies per cell, their stoichiometry between promoter-reporter fusions and their regulatory elements can vary, potentially causing physiological changes⁷. Additionally, maintaining plasmid stability requires continuous selection pressure, usually through antibiotics⁸, which can significantly alter gene expression^{9,10}. In biofilm studies, antibiotic pressure may be ineffective due to the protective nature of biofilms, preventing antibiotics from reaching all areas and leading to the loss of selective pressure. Antibiotic treatment can also disturb species interactions within polymicrobial biofilms, as different species may have varying susceptibilities¹¹.

An alternative approach involves chromosomal insertions, which preserve stoichiometry between promoters and regulators while eliminating the need for antibiotic pressure⁷. This is typically achieved via mobile elements delivered by *suicide vectors*, which are incapable of replication in the host cell and can integrate randomly or targeted chromosomal sites^{12–15}. The mini-Tn5 family of vectors widely used for this purpose, utilizes the transposon Tn5, which requires only a single enzyme (the transposase TnpA) and two 19-bp ending sequences (ES) for random insertion into the bacterial

chromosome^{16,17}. The pBAM1 vector¹⁸, used in this work, carries a streamlined version of the Tn5 system on a synthetic backbone free of restriction sites, designated for modularity and customisation (origin of replication, the origin of transfer, and resistance markers).

In this study, we employed both strategies using a series of promoter-probe vectors: pETS-IBECGLOW and pUCP20T-IBECGLOW (replicative promoter-probe plasmids), and pBAM-IBECGLOW (a transposon-based plasmid). These replicative plasmids carries all the necessary genetic machinery for autonomous replication inside the host cell, and the “promoter-probe” term indicates that it contains genetic elements to control gene expression. These elements typically include promoters, often coupled with reporter genes like Green Fluorescent Protein (GFP) to monitor gene expression levels. On the other hand, transposon-based plasmids possess the ability to move and integrate within the genome of a host organism. These vectors are designed to facilitate the simultaneous study of multiple gene promoters across a broad range of bacterial species. The core element of these vectors is the GLOW cassette, a synthetic DNA fragment designed to host a gene promoter, a fluorescent protein, and an optional, excisable antibiotic resistance gene. To prevent background signals, transcriptional terminators isolate these elements. In keeping with the design philosophy of pBAM1, the GLOW cassette is modular and restriction site free.

The pETS-IBECGLOW plasmids place the GLOW cassette in the backbone of the pETS130 plasmid previously used to test promoters in various bacterial species¹⁹. It incorporates the *ori* and the replication machinery of the broad-host-range plasmid pBBR1^{6,20}, enabling replication across a range of Proteobacteria^{6,21}. The pUCP20T-IBECGLOW plasmids house the GLOW cassette in the backbone of pUCP20T³. Meanwhile, the pBAM-IBECGLOW transposon-based vectors integrate the GLOW cassette into pBAM1, allowing random genomic integration and the inclusion of multiple constructs with the same bacterial strain. This study introduces vectors incorporating four FPs with different excitation and emission wavelengths: GFP_{mut3} (green fluorescent protein), eYFP (yellow fluorescent protein), mOrange (orange fluorescent protein), and E2-Crimson (far red fluorescent protein).

To demonstrate the utility of these plasmids (pETS-IBECGLOW, pUCP20T-IBECGLOW and pBAM-IBECGLOW), we used them to study the expression dynamics of the ribonucleotide reductase (RNR) network. RNRs

provide the deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) necessary for DNA replication and repair²². RNRs are classified into three different classes (I, II and III). *Pseudomonas aeruginosa* encodes three classes of RNR^{22,23} each with distinct biochemical properties and triggered under different environmental conditions. Class Ia RNR (*nrdAB*, controlled by the *PnrdA* promoter) is constitutively expressed and active only in the presence of oxygen). Class II RNR (*nrdJab*, controlled under the *PnrdJ* promoter), is active under both aerobic and anaerobic conditions, specifically transcriptionally induced during biofilm formation^{24,25} and under stress stimuli²⁶. Class III RNR (*nrdDG*, controlled by the *PnrdD* promoter) is induced under anaerobic conditions²⁷. Using the IBECGLOW plasmids, we monitored the coordinated expression of these RNR classes and visualised their expression patterns within oxygen gradients in *P. aeruginosa* biofilm.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains used in this study, as listed in Supplementary Table S1, were routinely cultured in Luria-Bertani (LB) broth at 37 °C. LB broth supplemented with 1% w/v KNO₃ (LBN) was used for anaerobic growth conditions. *Escherichia coli* S17 λ pir was used for procedures involving pBAM1 plasmid and its derivatives, while *E. coli* DH5 α was used for all other plasmid construction steps. The wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*, PAO1 and PA14, were used as references. Antibiotics were added when necessary at the following concentrations: for *E. coli*, 10 μ g/mL gentamicin (Gm^R), 50 μ g/mL kanamycin (Kn^R), 50 μ g/mL ampicillin (Amp^R), 15 μ g/mL tetracycline (Tc^R); for *P. aeruginosa*, 100 μ g/mL gentamicin (Gm^R), 300 μ g/mL carbenicillin (Cb^R), 40 μ g/mL tetracycline (Tc^R).

Synthesis of the GLOW cassette

The GLOW cassette was synthesised by ThermoFisher using the GeneArt tool. Its design aimed to create a transcriptional fusion between gene promoters and fluorescent proteins (FPs), minimizing non-specific background expression and allowing adding an antibiotic resistance gene. Each element can be inserted through multiple cloning sites containing the appropriate restriction enzyme recognition sites. A truncated chloramphenicol transferase gene (*cat*) was included between the promoter and FP multicloning sites to form a transcriptional fusion, optimizing fluorescent protein expression. Both the FP and *cat* genes were equipped with their own ribosome binding site (RBS).

Two translational terminators (transterminators) were added; the first after the truncated *cat*, and the second was inserted after the truncated *cat*, and the second before the FP cloning site. In addition, three transcriptional terminators (Ω terminators) were included, two flanking the cassette and the third following the FP transterminator (see Results section for more details). The synthetic cassette was then cloned into the pEX vector, creating the pEX-A-GLOW vector.

DNA manipulation and plasmid construction

Unless otherwise noted, all reagents and kits for DNA manipulation were obtained from ThermoFisher Scientific. Plasmids used and generated in this study are listed in Supplementary Table S1, and PCR primers are listed in Supplementary Table S2. Plasmid DNA was extracted and purified using the GeneJET Plasmid MiniPrep Kit, following the manufacturer's protocols. DNA digestion was carried out with conventional restriction enzymes, and ligation was performed using T4 DNA ligase (Invitrogen). PCR amplification was conducted using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase according to the manufacturer's instructions. PCR products and digested DNA fragments were purified using the GeneJET Gel Purification Kit. Purified PCR products were first cloned into the blunt vector pJET1.2 (CloneJET PCR Cloning Kit) and verified by colony PCR using primers 1-2 or specific primers of the cloned fragment, with DreamTaq Polymerase Master Mix. Additional DNA manipulations followed standard procedures²⁸. Unless otherwise specified, *P. aeruginosa* was transformed by electroporation as described previously²⁹.

To generate the replicative promoter-probe plasmid pETS-IBECGLOW, the GLOW cassette was excised from pEX-A-GLOW via *Xba*I digestion. The backbone of the pETS130 plasmid¹⁹ was amplified by PCR (primers 3-4) and digested with *Xba*I. The resulting fragment was 5'-dephosphorylated using FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase and ligated with the digested GLOW cassette to create the pETS-IBECGLOW plasmid base (lacking FPs, antibiotic resistance, and promoters). FPs, antibiotic resistance genes and promoters were added to complete the plasmid.

FP genes (E2-Crimson, eYFP, GFPmut3 and mOrange) were amplified by PCR (primers 11-18), with *Sac*I and *Apa*I restriction sites incorporated. The PCR products were digested with *Sac*I and *Apa*I and cloned into the pETS-IBECGLOW plasmid base, which was also digested with *Sac*I and *Apa*I.

Antibiotic resistance genes under constitutive promoters were PCR-amplified with *Aat*II restriction sites. The *aacC1* gene (gentamicin resistance) flanked by loxP sites was amplified from plasmid pUCGmlox³⁰ (primers 5-6), the *tet* gene (tetracycline resistance) from plasmid pEX18Tc³¹ (primers 7-8), and the *bla* gene (ampicillin/carbenicillin resistance) from

plasmid pJET1.2 (primers 9-10). All products were digested with *Aat*II and cloned into the pETS-IBECGLOW base, which had been similarly digested and 5'-dephosphorylated.

Promoters for ribonucleotide reductase genes *nrdA* (class Ia), *nrdJ* (class II) and *nrdD* (class III) were PCR amplified (primers 20-25) from *P. aeruginosa* PAO1 (for class I and II RNR promoters) or *P. aeruginosa* PA14 (for class III RNR promoter) genomic DNA. The PCR products were digested with *Bam*HI and *Sma*I or *Cla*I and cloned into pETS-IBECGLOW plasmid base.

After incorporating various combinations of promoters, FPs, and antibiotic resistance genes, the GLOW cassettes were transferred from pETS-IBECGLOW to create the pBAM-IBECGLOW and pUCP20T-IBECGLOW plasmids. The GLOW cassettes were excised by *Xba*I digestion and cloned into *Xba*I-digested, 5'-dephosphorylated pBAM1¹⁸ and pUCP20T plasmids. The finished plasmids were electroporated into *P. aeruginosa* PAO1, and transposons from pBAM-IBECGLOW plasmids were mobilized into the genome as previously described¹⁸ (Figure 1C).

The complete sequences of the pBAM-IBECGLOW and pUCP20T-IBECGLOW plasmids were verified by sequencing. Sequences are available in GeneBank under the accession numbers listed in Supplementary Table S3.

Evaluation of fluorescent protein expression under aerobic and anaerobic conditions.

For aerobic measurements, *P. aeruginosa* PAO1 strains carrying the GLOW cassette were grown ON in LB medium supplemented with the appropriate antibiotics at 37°C with shaking at 200 rpm. Additionally, *P. aeruginosa* PAO1 mutant strains carrying the GFP*mut3* and E2-Crimson FPs were included as controls. The bacterial cultures were inoculated at an optical density (OD₅₅₀) of ~ 0.05 into a 96-Well Black/Clear Bottom microtiter plate (Thermo Fisher Scientific) and placed in a SPARK multimode microplate reader (Tecan), equipped with the Tecan's Humidity Cassette (Tecan). The strains were cultured for 2.5 h at 37°C with shaking at 200 rpm, and ventilation was provided every 5 minutes for 10 seconds, maintaining 21% O₂. After the 2.5 h incubation, fluorescence measurements of different FPs were taken every 30 minutes for up to 22 h.

For anaerobic fluorescence quantifications, cells were cultured under the same conditions as for the aerobic measurements for the first 2.5 hours. Then, the oxygen concentration was reduced to 0.1% to induce anaerobic growth conditions. FPs fluorescence was measured every 30 min, with a 20-minute pulse of 21% O₂ introduced every 22 h to ensure accurate fluorescence readings. Fluorescence data were normalized to cell growth (OD₅₅₀).

Fluorescence microscopy

E. coli DH5 α was used to express transcriptional fusions of each *P. aeruginosa* RNR promoter (Class Ia, *PnrdA*; Class II, *PnrdJ* and Class III, *PnrdD*), in the pETS-IBECGLOW plasmids (Supplementary Table 1). The different *E. coli* strains carrying the pETS-IBECGLOW plasmids were grown ON in LB medium supplemented with 10 μ g/mL gentamicin at 37°C with shaking at 200 rpm and cultured until they reached the exponential phase (OD₅₅₀ ~ 0.5). To confirm that the detected fluorescence was promoter-dependent, the *E. coli* strains carrying promoter-less pETS-IBECGLOW plasmids were included as negative controls.

For microscopy, 1 mL of each bacterial culture was harvested by centrifugation (5000 rpm, 5 min) and washed with 1 mL of PBS 1X. Cells were visualized using a 100X objective on a Nikon ECLIPSE Ti-S/L100 inverted fluorescence microscope (Nikon) coupled with a Nikon DS-Qi2 camera (Nikon). Image analysis and processing were performed using the ImageJ/Fiji software.

Static biofilm formation and fluorescence measurement

P. aeruginosa PAO1 biofilm was formed in 96-well microtiter plates (Corning, Inc. Costar) as previously described²⁴. Briefly, 200 μ L of cell suspension was inoculated in LB medium supplemented with 0.2% glucose in each well. 200 μ L of autoclaved distilled water was added to the peripheral wells to minimise water loss. The microtiter plates were incubated at 37°C for 24, 48, 72, and 96 h. After incubation, planktonic cells were aspirated, and the wells were washed three times with phosphate buffer saline (PBS). Biofilm fluorescence was measured using the SPARK multimode microplate reader (Tecan).

To quantify biofilm biomass, the biofilm was fixed with 99% methanol for 15 min and air-dried. Then, 200 μ L of 1% crystal violet solution was added

to each well. After 5 min, excess crystal violet was removed and the plates were washed until all unbound stain was eliminated. The cell-bound crystal violet was dissolved in 33% acetic acid, and the absorbance at OD₅₇₀ was measured using the SPARK multimode microplate reader (Tecan). Biofilm fluorescence was normalized by dividing the fluorescence values by the biofilm growth readings (OD₅₇₀) to account for biofilm growth.

Continuous-flow biofilm formation and confocal laser scanning microscopy

A culture of *P. aeruginosa* PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C was adjusted to an OD₅₅₀ of 0.3 and inoculated into a flow cell system as previously described³². The biofilms were grown in LB medium supplemented with 0.2% glucose. After a 2-hours incubation period, the medium was pumped through the flow cells at a constant flow rate of 42 μ L/min using an Ismatec ISM 943 peristaltic pump (Ismatec). After 96 hours of growth at room temperature, the biofilm were visualized using a Zeiss LSM 800 confocal laser scanning microscope (CSLM). Excitation wavelengths of 488 nm and 640 nm were used to visualize the fluorescent proteins GFP*mut3* and E2-Crimson, respectively. Image processing was performed using ImageJ, and a 3D reconstructions of biofilms were generated using IMARIS software.

Results and Discussion

GLOW cassette design and construction of the pIBECGLOW plasmid family

We developed a family of promoter-probe vectors using a synthetic GLOW cassette designed to facilitate the monitoring of bacterial gene expression under varying environmental conditions. Our design incorporates improved promoter-dependent fluorescent proteins (FPs) as a reporter gene while minimising non-specific background activity.

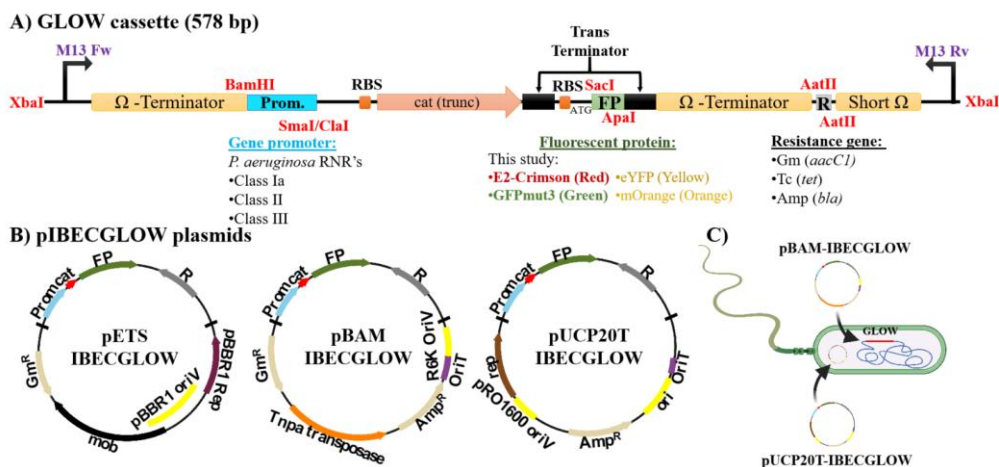


Figure 1. Structure of the GLOW cassette and pIBECGLOW plasmids construction. A) Schematic representation of the GLOW cassette, highlighting its main components: promoter (Prom.), fluorescent protein (FP), resistance gene (R), truncated chloramphenicol acetyltransferase (*cat* trunc), translational terminators (Trans terminator), transcriptional terminators (Ω terminator), and a shorter transcriptional terminator (Short Ω). Restriction enzyme sites used in this study were marked in red, while M13 primers are shown in purple. Promoters from *P. aeruginosa* RNR's genes, FPs, and the resistance genes used in this study are listed under their respective restriction sites. B) Diagram of the main pIBECGLOW plasmids and their key features. C) Illustration of the two primary strategies for generating *P. aeruginosa* PAO1 IBECGLOW strains. Image created with www.biorender.com.

The 578 bp GLOW cassette (GeneBank under accession number PP400727, see Supplementary Table S3) encodes sequences for cloning the

promoter region of interest (Prom. in Fig. 1A), fluorescent proteins (FP in Fig. 1A), and antibiotic resistance gene (R in Fig. 1A) for strain selection. These elements are flanked by multiple cloning sites and three transcriptional terminators (Ω terminators in Fig. 1A) to prevent non-specific background signals. To ensure proper transcriptional termination, promoter regions were fused to a truncated chloramphenicol acetyltransferase (cat(trunc) in Fig. 1A).

For the construction of the pETS-IBECGLOW plasmids, we streamlined the cloning process. First, four FPs (GFP*mut3*, E2-Crimson, mOrange, eYFP) were cloned into the GLOW cassette, generating promoterless and resistanceless variants of pETS-IBECGLOW (see Material and Methods, Supplementary Table 1 and Fig. 1). Next, resistance genes commonly used for *P. aeruginosa* selection (gentamicin, Gm^R; tetracyclin, Tc^R; and carbenicillin, Amp/Cb^R) were cloned (see Material and Methods). To validate our constructs, we cloned the promoter regions from *P. aeruginosa* PAO1 RNRs classes (class Ia-*PnrDA* and class II-*PnrDJ*) and one promoter from *P. aeruginosa* PA14 RNR class (class III-*PnrDD*), which have been extensively studied in our laboratory (see Fig. 1A)^{23,24,33}.

Class I and II RNRs are active under aerobic conditions, while class II and III RNRs function under anaerobic conditions¹⁹. However, the expression patterns differ: class I RNR is predominantly expressed under aerobic conditions, while class II and III RNRs are highly expressed during late growth stages or under anaerobic conditions^{23,24}.

Modifications to the GLOW cassette were incorporated into the pETS-IBECGLOW plasmid, derived from the broad-host range of replication pETS130 plasmid (see Fig. 1B), making it suitable for gene expression studies³⁴. A high-copy-number replicative plasmid variant pUCP20T-IBECGLOW, was constructed from the pUCP20T plasmid (see Fig. 1B and Supplementary Table 1). Additionally, the GLOW cassette can be inserted as a single chromosomal copy using the Tn5 system present in the non-replicative pBAM-IBECGLOW plasmid (Fig. 1B). Combining pUCP20T and pBAM-IBECGLOW ensures optimal accurate measurement of gene expression in both systems (see Fig. 1C).

As a proof of concept, the three RNR class promoters (*PnrDA*, *PnrDJ* and *PnrDD*) from *P. aeruginosa* were cloned into the pBAM-IBECGLOW and pUCP20-IBECGLOW plasmids. These promoters control genes that are

expressed under different environmental conditions such as aerobiosis, anaerobiosis or biofilm formation.

All plasmids carrying the GLOW cassette, in combination with various fluorescent proteins, resistance genes and RNR promoters, are listed in Supplementary Table 1.

Fluorescence validation of the GLOW cassette

We aimed to validate all constructed pETS-IBECGLOW promoter-probe plasmids, which carried various promoter-FP-antibiotic resistance gene combinations, as well as their promoterless counterparts. Initial testing was conducted in *E. coli* DH5 α using fluorescence microscopy (see Material and Methods and Fig. 2A). We measured the fluorescence of GFPmut3 (505-511 nm, green range), eYFP (514-527 nm, yellow range), mOrange (548-563 nm, orange range) and E2-Crimson (611-646 nm far-red range). Fluorescence microscopy confirmed that the GLOW cassette successfully expressed each FP under the control of the three *P. aeruginosa* RNR promoters (class Ia-PnrA, class II-PnrJ and class III-PnrD) (Fig. 2A). As expected, promoterless GLOW constructs showed no fluorescence, and no non-specific background signals were detected under these conditions.

While these results demonstrated that the GLOW cassette functions correctly in *E. coli*, the tested promoters originated from *P. aeruginosa* PAO1 or PA14, requiring further validation in those strains.

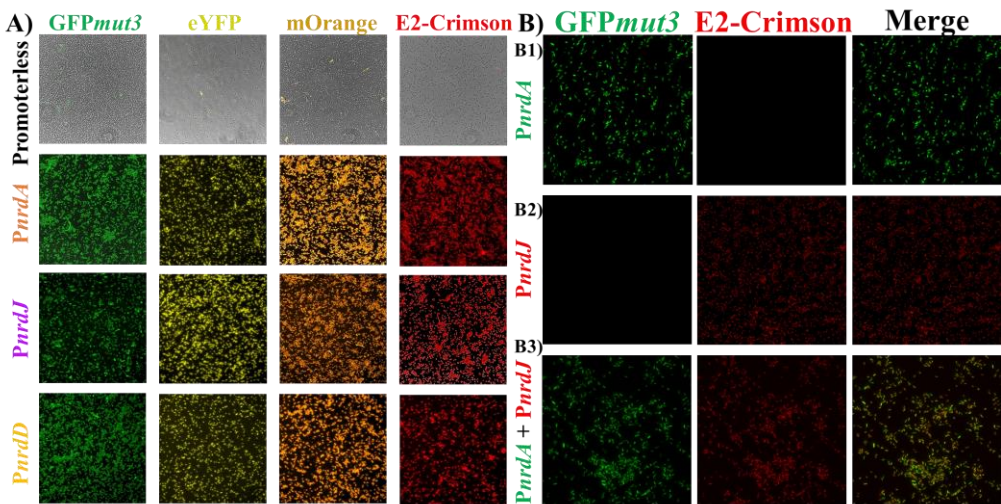


Figure 2. pETS-IBECGLOW fluorescence and crosstalk. A) Fluorescence microscopy images of *E. coli* DH5 α transformed with pETS-IBECGLOW plasmids carrying different RNRs promoters and FP combinations. Promoterless plasmids: pETS-IBECGLOW-GmR-GFPmut3, pETS-IBECGLOW-GmR-eYFP, pETS-IBECGLOW-GmR-mOrange and pETS-IBECGLOW-GmR_E2-Crimson. Single combination plasmids: pETS-IBECGLOW-GmR-PnrdA(PAO1)_GFPmut3, pETS-IBECGLOW-GmR-PnrdJ(PAO1)_GFPmut3, pETS-IBECGLOW-GmR-PnrdD(PA14)_GFPmut3, pETS-IBECGLOW-GmR-PnrdA(PAO1)_eYFP, pETS-IBECGLOW-GmR-PnrdJ(PAO1)_eYFP, pETS-IBECGLOW-GmR-PnrdD(PA14)_eYFP, pETS-IBECGLOW-GmR-PnrdA(PAO1)_mOrange, pETS-IBECGLOW-GmR-PnrdJ(PAO1)_mOrange, pETS-IBECGLOW-GmR-PnrdD(PA14)_mOrange, pETS-IBECGLOW-GmR-PnrdA(PAO1)_E2-Crimson, pETS-IBECGLOW-GmR-PnrdJ(PAO1)_E2-Crimson and pETS-IBECGLOW-GmR-PnrdD(PA14)_E2-Crimson. B) Fluorescence microscope image analysis of FPs expression in *P. aeruginosa* PAO1-IBECGLOW strains. Single combinations: B1) PnrdA + GFPmut3: PAO1 IBECGLOW-RNR(A) GFP, B2) PnrdJ + E2-Crimson: PAO1 IBECGLOW-RNR(J) E2C. Double combination: B3) PnrdA + GFPmut3 & PnrdJ + E2-Crimson: PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C (see Material and Methods).

We then assessed crosstalk between different FPs (see Fig. 3). GFPmut3 and E2-Crimson emerged as the most compatible pair, showing minimal crosstalk when used together. To explore this combination further, we tested dual FP expression in a *P. aeruginosa* PAO1 strain. This led to the creation of several *P. aeruginosa* PAO1-IBECGLOW strains: PAO1 IBECGLOW-RNR(A) GFP [PAO1::IBECGLOW:PnrdA_GFPmut3], PAO1 IBECGLOW-RNR(J) E2C [PAO1::pUCP20T-IBECGLOW:PnrdJ_E2-Crimson] and PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C [PAO1::IBECGLOW:PnrdA_GFPmut3 + pUCP20T-IBECGLOW:PnrdJ_E2-Crimson]. These were examined under an inverted fluorescence microscope, as described in the Materials and Methods (see Fig. 2B).

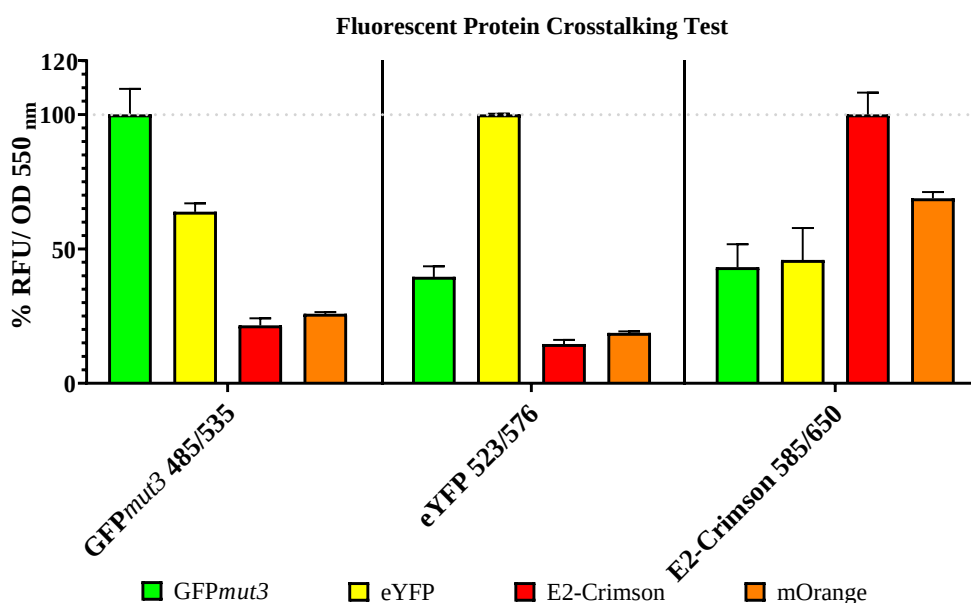


Figure 3: Fluorescent protein crosstalk analysis. Crosstalk measurements of FPs were performed using a SPARK multimode microplate reader (Tecan) with a monochromator filter. The X-axis represents various excitation/emission wavelengths ($Ex\lambda_{nm}/Em\lambda_{nm}$). Fluorescence signals were normalized to the optical density (OD_{550nm}). All FPs available in our laboratory were used in this analysis. mOrange fluorescence was excluded due to lower signal strength than other FPs (data not shown). Strains tested: *P. aeruginosa* PAO1 GFPmut3 (GFPmut3=Green), *P. aeruginosa* PAO1 eYFP (eYFP=Yellow), *P. aeruginosa* PAO1 pUCP20T-IBECGLOW:Pnr*dJ*(PAO1)_E2-Crimson (E2-Crimson=Red) and PAO1 IBECGLOW-RNR(J) mOrange (mOrange=Orange).

The PAO1-IBECGLOW strains, carrying class Ia RNR. (*Pnr*d*A* controlling the GFPmut3 expression) and class II RNR (*Pnr*d*J* controlling the E2-Crimson expression) RNR promoters exhibited clear fluorescence without detectable crosstalk between the FPs (see Fig. 2-B3). These findings confirm that the GLOW cassette system, equipped with transcriptional terminators (Ω terminator) and translational terminators (Transterminator), is effective for gene reporter assays involving multiple FPs, without any crosstalk interference.

In vivo evaluation of the GLOW cassette under aerobic and anaerobic planktonic P. aeruginosa growth.

The primary goal of this study was to establish conditions for simultaneous gene expression analysis under specific environmental conditions. We focused on the differential expression of *P. aeruginosa* RNR genes, leveraging our prior experience with these systems. We created single and double GLOW cassette combinations to test whether *P. aeruginosa* PAO1 IBECGLOW strains could be used under different oxygen conditions. This was achieved by combining the IBECGLOW cassette transposition from the pBAM-IBECGLOW plasmid with the pUCP20T-IBECGLOW replicative plasmid (see Material and Methods). While the pUCP20T-IBECGLOW operates similarly to pETS130-IBECGLOW, we opted for pUCP20T-IBECGLOW due to its superior fluorescence response in our previous studies³.

The primary combination tested was pBAM-IBECGLOW-Gm^R-PnrdA(PAO1)_GPFmut3 and pUCP20T-IBECGLOW-Gm^R-PnrdJ(PAO1)_E2-Crimson. All fluorescence measurements were taken after an initial culture growth to ensure accurate assessment (see Material and Methods). We generated kinetic growth curves for these strains under aerobic or anaerobic conditions (see Fig. 4).

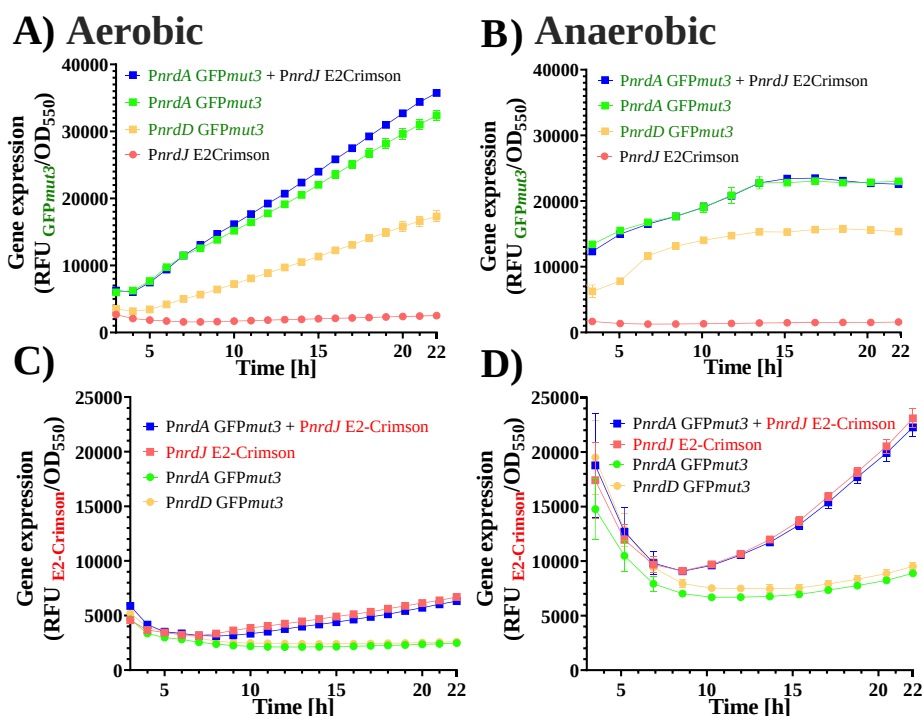


Figure 4. Grow curves of *P. aeruginosa* PAO1::IBECGLOW under aerobic and anaerobic conditions. Fluorescence measurements of GFPmut3 and E2-Crimson, corrected for growth (OD₅₅₀), were taken under aerobic (A, C) and anaerobic (B, D) growth conditions for *P. aeruginosa* PAO1::IBECGLOW strains: PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C (PnrDA GFPmut3 + PnrDJ E2-Crimson, Blue); PAO1 IBECGLOW-RNR(A) GFP (PnrDA GFPmut3, Green); PAO1 IBECGLOW-RNR(J) E2C (PnrDJ E2-Crimson, Red) and PAO1 IBECGLOW-RNR(D) GFP (PnrDD GFPmut3, Yellow). GFPmut3 relative fluorescent units (RFU) measurements (A, B), E2-Crimson RFU measurements (C, D). Expressed fluorescence is indicated by squares, and non-expressed fluorescence by circles. Results represent the mean of six independent replicates $\pm$ standard deviation.

Kinetic growth curves for the *P. aeruginosa* PAO1::IBECGLOW strains - single [PAO1 IBECGLOW-RNR(A) GFP; PAO1 IBECGLOW-RNR(J) E2C; PAO1 IBECGLOW-RNR(D) GFP] and double combinations (PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C) of RNR promoters and FP (see

Supplementary Table S1 and Fig. 4) confirmed that the system is effective for gene reporter measurement under varying oxygen conditions. We specifically explored the functionality of our GLOW cassette under aerobic and anaerobic conditions by using *P. aeruginosa* RNR promoters from class Ia (*PnrdA*), class III (*PnrdD*) to control GFPmut3 expression, and class II (*PnrdJ*) to control the E2-Crimson expression.

Under aerobic conditions (Fig. 4A and C), the expression of all three RNR genes was successfully detected. The class I (*PnrdA*) exhibited the highest expression levels (blue and green lines in Fig. 4A), exceeding those of class II (*PnrdJ*, red lines in Fig. 4C) and class III (*PnrdD*, yellow lines in Fig. 4A). These findings are consistent with previous quantitative RT-PCR studies in our laboratory³⁴. No crosstalk was observed between GFPmut3 and E2-Crimson when both fluorescence signals were measured simultaneously. GFPmut3 fluorescence was only detected in GFPmut3-expressing strains (green and yellow lines in Fig. 4A), with no signal in E2-Crimson-only strains (red line in Fig. 4A). Similarly, E2-Crimson fluorescence, was only observed in E2-Crimson expressing trains (red and blue lines in Fig. 4C), with no signal in GFPmut3-only strains (green and yellow lines in Fig. 4C). Dual fluorescence was detected exclusively in the *P. aeruginosa* PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C strain (blue lines in Fig. 4A and C).

Under anaerobic conditions (Fig. 4B and D), the GLOW cassette system also proved effective in the absence of oxygen (see Material and Methods). While class I RNR enzymes are expressed under aerobic conditions, they are not functional without oxygen. Both class II and III RNR, however are active under anaerobic conditions as previously described²⁴. Class II RNR is oxygen-independent, whereas class III operates only under strict anaerobic conditions¹⁹. Under aerobic conditions, class I RNR gene expression followed an exponential pattern (blue and green lines in Fig. 4A). In anaerobic conditions, there was a shift towards class II and class III RNR expression, with class II RNR being strongly induced (red and blue lines in Fig. 4D) and class III expressions also increasing, although not to the same extent as class II RNR (yellow lines in Fig 4B)³⁴. Notably, the gene expression levels of class I RNR under anaerobic conditions did not reach the same levels as under aerobic conditions (green and blue lines in Fig. 4A and B).

Importantly, no crosstalk between GFP*mut3* and E2-Crimson fluorescence was detected in the double GLOW cassette combinations under anaerobic conditions, consistent with the observations in aerobic conditions.

Detection of RNR expression under biofilm-forming conditions

It is well known that bacteria often form biofilm structures in natural environments and during host infections^{35–39}. This behavior has drawn increasing attention due to the implications of biofilms in altering gene expression patterns. In this study, we aimed to test the reliability of our GLOW cassette system under different conditions, including oxygen concentration and biofilm growth. Biofilms offer several advantages to bacteria, but the environmental conditions within them are not uniform⁴⁰. For example, oxygen deprivation occurs at the bottom of the biofilm due to differential oxygen consumption and perfusion of oxygen throughout the biofilm matrix⁴⁰. We performed two gene expression analyses under biofilm forming conditions using *P. aeruginosa* PAO1 IBECGLOW strains.

Biofilms were grown under static conditions in a 96 well plate for four days (Fig. 5), with fluorescence measurements taken at 24-, 48-, 72-, and 96-hours post-inoculation (see Material and Methods). The strains tested were *P. aeruginosa* PAO1 IBECGLOW-RNR(A) GFP (green lines), PAO1 IBECGLOW-RNR(J) E2C (red lines) and PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C (blue lines). The results were promising and showed expression patterns consistent with the corresponding RNR class. GFP*mut3*, under the control of class I RNR promoter (*PnrdA*), exhibited a slight decrease over the first 72 h, stabilizing at 96 h in both the PAO1 IBECGLOW-RNR(A) GFP (green lines) and PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C (blue lines) strains, likely due to biofilm formation (see Fig. 5A). In contrast, E2-Crimson, controlled by the class II (*PnrdJ*) RNR promoter (PAO1 IBECGLOW-RNR(J) E2C (red lines) and PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C (blue lines)) strains, showed a steady increase in expression from 24 h onwards (see Fig. 5B). Basal levels of fluorescence were recorded when measuring the opposite FP.

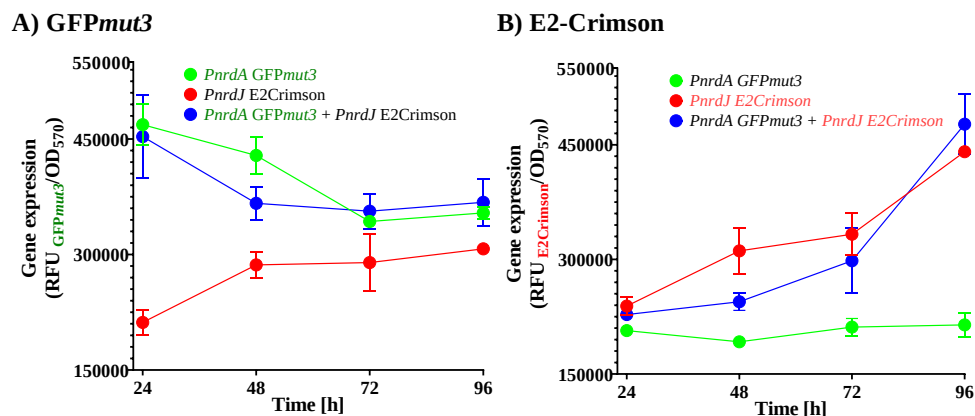


Figure 5. *P. aeruginosa* PAO1::IBECGLOW static biofilm studies. A) RFU GFPmut3/OD_{570nm} measurements of *P. aeruginosa* PAO1 IBECGLOW strains during static biofilm growth. B) RFU E2-Crimson/OD_{570nm} measurements of *P. aeruginosa* PAO1 IBECGLOW strains during static biofilm growth. Strains monitored: PAO1 IBECGLOW-RNR(A) GFP (*PnrDA* GFPmut3, Green), PAO1 IBECGLOW-RNR(J) E2C (*PnrDJ* E2-Crimson, Red) and PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C (*PnrDA* GFPmut3 + *PnrDJ* E2-Crimson, Blue). Fluorescence measurements were normalized to biofilm growth (OD_{570nm}) and taken over 24 to 96 h of biofilm growth. The results represent the mean of six experimental replicas $\pm$ standard deviation.

In a second biofilm set of experiments, we developed a continuous-flow biofilm model using flow cells (see Material and Methods), which closely mimics *in vivo* biofilms during chronic infections. We cultivated a four-day biofilm and used confocal microscopy to visualize RNR usage throughout the biofilm (Fig. 6). Previous studies have shown that an oxygen gradient develops during biofilm formation, with full establishment occurring upon biofilm maturation⁴¹ (see Fig. 6D). Oxygen concentrations are highest at the top of the biofilm, where the extracellular biofilm matrix is not abundant and similar to aerobic conditions^{24,42}. As the biofilm matures and bacterial growth increases, oxygen perfusion diminish, leading to the depletion of oxygen in deeper biofilm layers, resulting in microaerophilic or anaerobic conditions. As we mentioned earlier, class I RNR are expressed and active under aerobic conditions, while class II RNR increase their expression in response to decrease oxygen levels. Class II RNRs remain active in microaerophilic or

anaerobic, modulating *P. aeruginosa*'s gene expression (Fig. 6). Our experimental results with *P. aeruginosa* IBECGLOW strains align with these findings. GFP*mut3* expression, driven by the class I RNR promoter, was observed only in the upper part of the biofilm layers (Fig. 6B). As oxygen concentration decreased deeper in the biofilm, GFP*mut3* expression increased, creating a distinct orange layer due to overlap between the two FPs (see Fig. 6B). In the deepest biofilm layers, when oxygen was nearly absent, E2-Crimson fluorescent dominated, as expected (see Fig. 6B-C).

These results demonstrate the utility of the GLOW system for bacterial applications. The GLOW cassette allows simultaneous monitoring of multiple gene expressions, as demonstrated by this study, where we tracked two RNR genes using two FPs (GFP*mut3* and E2-Crimson) without crosstalk fluorescent (see Fig. 2, 4, 5, 6). The system's versatility also enables its use in tracking unrelated genes, allowing for the observation of various biological processes such as environmental responses (e.g., temperature, osmolarity, nutrient availability, etc.) or bacterial pathogenesis (e.g., virulence, host infection, antimicrobial resistance). Additionally, our vector system supports translational fusions between FPs and proteins of interest^{43,44}, facilitating protein dynamics studies alongside gene expression monitoring. Other applications include visualization organelles, labelling cells and tissues to study morphology or movement⁴³, and using FPs as cellular sensors to measure enzyme activity or intracellular ion and metabolite concentration⁴³, and using FPs can generate reactive oxygen species (ROS), which can inactivate proteins, selectively kill cells, or study ROS signaling pathways⁴³. These FP-based methods are invaluable for high-throughput screening of drug candidates and basic research⁴³.

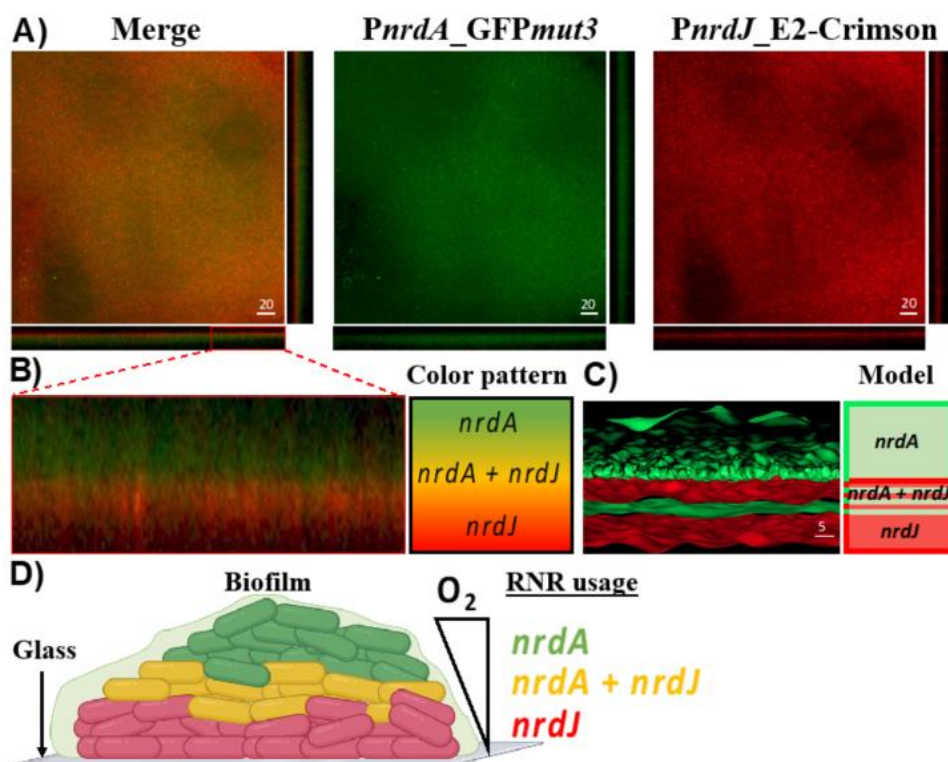


Figure 6. RNR expression in a biofilm. A) CLSM images of a PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C continuous-flow biofilm. GFPmut3 and E2-Crimson are shown in green and red, respectively. Scale bars represent 20 μm . B) Enlarged orthogonal section of the biofilm, showing RNR expression patterns. C) 3D biofilm representation using IMARIS, with GFPmut3 and E2-Crimson expression shown in green and red. Scale bar represents 5 μm . D) Schematic representation of RNR usage within the biofilm based on the experimental data. Image created with www.biorender.com.

In this study, we applied our vector system to biofilm research, a focal point of our research group's work due to its relevance as a model for chronic infections^{35,36,45}. Our results highlight the system's versatility in enabling simultaneous observation of multiple gene expression patterns within both oxygen (aerobic and anaerobic) and spatial gradients (biofilm). For the first time, we could distinguish the differential expression patterns of the different RNR classes in a mature biofilm. The GLOW system is thus a powerful tool for studying complex biological systems, such as the interaction of multiple pathogens within biofilms or during antimicrobial treatment. Furthermore,

GLOW plasmids with transcriptional fusions can be constructed in just two or three steps, streamlining experimentation.

In conclusion, the GLOW system design is robust, and the experimental results obtained with the GLOW cassette are reproducible. This methodology is promising, and its potential combination with other techniques will expand its application. Overall, using our novel fluorescent reporter vectors or GLOW cassette design provides a straightforward approach for gaining new insights into bacterial regulatory mechanisms.

Acknowledgements

We are grateful to Lucas Pedraz, Maria del Mar Cendra for the help some plasmid construction and for constructive discussions.

This study was partially supported by grants PID2021-125801OB-I00, PLEC2022-009356 and PDC2022-133577-I00 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and “ERDF A way of making Europe”, the CERCA programme and AGAUR-Generalitat de Catalunya (2021SGR01545), the European Regional Development Fund (FEDER) and Catalan Cystic Fibrosis association. DM is supported with a FI grant from the Generalitat de Catalunya (2020-FI-B-00175). N.B-C. acknowledges the Margarita Salas grant from the Ministerio de Universidades, Spain, funded by the European Union-Next Generation EU.

References

1. Vandevenne, M., Delmarcelle, M. & Galleni, M. RNA regulatory networks as a control of stochasticity in biological systems. *Front Genet* **10**, 453416 (2019).
2. Kremers, G. J., Gilbert, S. G., Cranfill, P. J., Davidson, M. W. & Piston, D. W. Fluorescent proteins at a glance. *J Cell Sci* **124**, 157 (2011).
3. Barbier, M. & Damron, F. H. Rainbow Vectors for Broad-Range Bacterial Fluorescence Labeling. *PLoS One* **11**, (2016).
4. Miller, W. G., Leveau, J. H. J. & Lindow, S. E. Improved *gfp* and *inaZ* Broad-Host-Range Promoter-Probe Vectors. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.11.1243> **13**, 1243–1250 (2007).
5. Schneider, K. & Beck, C. F. Promoter-probe vectors for the analysis of divergently arranged promoters. *Gene* **42**, 37–48 (1986).
6. Jain, A. & Srivastava, P. Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol Lett* **348**, 87–96 (2013).
7. Raj, A. & van Oudenaarden, A. Nature, Nurture, or Chance: Stochastic Gene Expression and Its Consequences. *Cell* **135**, 216–226 (2008).
8. Lau, B. T. C., Malkus, P. & Paulsson, J. New quantitative methods for measuring plasmid loss rates reveal unexpected stability. *Plasmid* **70**, 353–361 (2013).
9. Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M. T. & Chikindas, M. L. Control of biofilm formation: Antibiotics and beyond. *Appl Environ Microbiol* **83**, (2017).
10. Esani, S., Chen, T., Leung, K. P. & Laar, T. A. Van. Transcriptome Sequence of Antibiotic-Treated *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Resour Announc* **8**, (2019).
11. Anju, V. T. *et al.* Polymicrobial Infections and Biofilms: Clinical Significance and Eradication Strategies. *Antibiotics* **11**, (2022).
12. Choi, K. H. *et al.* A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nature Methods* **2**, 443–448 (2005).
13. Kalogeraki, V. S. & Winans, S. C. Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. *Gene* **188**, 69–75 (1997).
14. Silva-Rocha, R. & de Lorenzo, V. Chromosomal Integration of Transcriptional Fusions. *Methods in Molecular Biology* **1149**, 479–489 (2014).

15. de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**, 386–405 (1994).
16. Green, B., Bouchier, C., Fairhead, C., Craig, N. L. & Cormack, B. P. Insertion site preference of Mu, Tn5, and Tn7 transposons. *Mob DNA* **3**, 1–6 (2012).
17. Reznikoff, W. S. Transposon Tn5. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091656> **42**, 269–286 (2008).
18. Martínez-García, E., Calles, B., Arévalo-Rodríguez, M. & De Lorenzo, V. PBAM1: An all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC Microbiol* **11**, 1–13 (2011).
19. Sjöberg, B. M. & Torrents, E. Shift in ribonucleotide reductase gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* during infection. *Infect Immun* **79**, 2663–2669 (2011).
20. Antoine, R. & Locht, C. Isolation and molecular characterization of a novel broad-host-range plasmid from *Bordetella bronchiseptica* with sequence similarities to plasmids from gram-positive organisms. *Mol Microbiol* **6**, 1785–1799 (1992).
21. Silva-Rocha, R. *et al.* The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res* **41**, (2013).
22. Torrents, E. Ribonucleotide reductases: Essential enzymes for bacterial life. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 89098 (2014).
23. Torrents, E., Poplawski, A. & Sjöberg, B.-M. Two Proteins Mediate Class II Ribonucleotide Reductase Activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 16571–16578 (2005).
24. Crespo, A., Pedraz, L., Astola, J. & Torrents, E. *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Deficient Biofilm Formation in the Absence of Class II and III Ribonucleotide Reductases Due to Hindered Anaerobic Growth. (2016) doi:10.3389/fmicb.2016.00688.
25. Crespo, A., Blanco-Cabra, N. & Torrents, E. Aerobic Vitamin B12 Biosynthesis Is Essential for *Pseudomonas aeruginosa* Class II Ribonucleotide Reductase Activity During Planktonic and Biofilm Growth. *Front Microbiol* **9**, 986 (2018).
26. Crespo, A., Pedraz, L., Van Der Hofstadt, M., Gomila, G. & Torrents, E. Regulation of ribonucleotide synthesis by the *Pseudomonas aeruginosa* two-component system AlgR in response to oxidative stress. *Scientific Reports* 2017 7:1 **7**, 1–15 (2017).

27. Crespo, A., Gavalda, J., Julián, E. & Torrents, E. A single point mutation in class III ribonucleotide reductase promoter renders *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inefficient for anaerobic growth and infection OPEN. doi:10.1038/s41598-017-14051-2.
28. Molecular Cloning: A Laboratory Manual . Joseph Sambrook , David W. Russell . <https://doi.org/10.1086/394015> **76**, 348–349 (2001).
29. Chuanchuen, R., Narasaki, C. T. & Schweizer, H. P. Benchtop and microcentrifuge preparation of *Pseudomonas aeruginosa* competent cells. *Biotechniques* **33**, 760–763 (2002).
30. Quénee, L., Lamotte, D. & Polack, B. Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechniques* **38**, 63–67 (2005).
31. Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. & Schweizer, H. P. A broad-host-range FLP-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* **212**, 77–86 (1998).
32. Blanco-Cabra, N. *et al.* Characterization of different alginate lyases for dissolving *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Scientific Reports* 2020 10:1 **10**, 1–10 (2020).
33. Jordan, A. *et al.* Ribonucleotide reduction in *Pseudomonas* species: Simultaneous presence of active enzymes from different classes. *J Bacteriol* **181**, 3974–3980 (1999).
34. Crespo, A., Pedraz, L. & Torrents, E. Function of the *Pseudomonas aeruginosa* NrdR Transcription Factor: Global Transcriptomic Analysis and Its Role on Ribonucleotide Reductase Gene Expression. *PLoS One* **10**, e0123571 (2015).
35. Lebeaux, D., Ghigo, J.-M. & Beloin, C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev* **78**, 510 (2014).
36. Flemming, H. C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* 2016 14:9 **14**, 563–575 (2016).
37. Costerton, J., Stewart, P. & Greenberg, E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* (1979) **284**, (1999).
38. Stewart, P. S. & Costerton, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135–138 (2001).

39. O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49–79 (2000).
40. Goller, C. C. & Romeo, T. Environmental influences on biofilm development. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**, 37–66 (2008).
41. Jo, J., Price-Whelan, A. & Dietrich, L. E. P. Gradients and consequences of heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **20**, 593 (2022).
42. Torrents, E., Westman, M., Sahlin, M. & Sjö, B.-M. Ribonucleotide Reductase Modularity ATYPICAL DUPLICATION OF THE ATP-CONE DOMAIN IN *Pseudomonas aeruginosa*. (2006) doi:10.1074/jbc.M601794200.
43. Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S. & Lukyanov, K. A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev* **90**, 1103–1163 (2010).
44. Schulte, M., Grotheer, L. & Hensel, M. Bright individuals: Applications of fluorescent protein-based reporter systems in single-cell cellular microbiology. *Mol Microbiol* **121**, 605–617 (2024).
45. Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O. & Beloin, C. From *in vitro* to *in vivo* Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens* **2**, 288–356 (2013).

Supplementary Material

Novel Fluorescent Reporter Vectors for Monitoring Bacterial Promoter Activity under different environmental condition

Domingo Marchan¹, Alba Rubio-Canalejas¹, Núria Blanco-Cabra^{1,2}, Eduard Torrents^{1,2*}

¹Bacterial Infections: Antimicrobial Therapies, Institute for Bioengineering of Catalonia (IBEC), The Barcelona Institute of Science and Technology, Barcelona, Spain.

²Microbiology Section, Department of Genetics, Microbiology and Statistics, Faculty of Biology, University of Barcelona, 643 Diagonal Ave., 08028, Barcelona, Spain.

*Corresponding author; Eduard Torrents, e-mail: etorrents@ibecbarcelona.eu.

Supplementary Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study:

Plasmids are listed with shortened, simplified names (referred to as...), which are commonly used throughout the text. For bacterial strains, a detailed genotype description is also provided. References to the sources of plasmids and strains are provided here, for convenience of the reader. Abbreviations are used as follows: Amp^R, Cm^R, Gm^R, Km^R, Sm^R, Tc^R, Tp^R: resistances to ampicillin, chloramphenicol, gentamycin, kanamycin, streptomycin, tetracycline, and trimethoprim. Cb^R: resistance to carbenicillin, indicated instead of ampicillin when carbenicillin is the antibiotic of use. ATCC, CECT: American and Spanish Type Culture Collections. Stock: Laboratory stock strain. ThermoF: ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA.

Name	Reference name	Description	Source
Plasmids			
pETS130-GFP	pETS130	Broad-host-range, replicative plasmid; Gm ^R	(2)
pBAM1	pBAM1	Modular transposon-delivery suicide vector carrying a modified Tn5 system; Amp ^R , Km ^R	(3)
pJET1.2	pJET	Commercial carrier plasmid, source for ampicillin/carbenicillin resistance (<i>bla</i>); Amp ^R	ThermoF
pEX18Tc	pEX18Tc	Source for tetracycline resistance (<i>tet</i>); Tc ^R	(4)
pUCGmlox	pUCGmlox	Source for gentamicin resistance (<i>aacC1</i>) between <i>loxP</i> recombination sites; Gm ^R , Amp ^R	(5)
pUCP20T	pUCP20T	Broad-host-range, replicative plasmid; Amp ^R	(6)
pUCP30T_E2-Crimson	pUCP_E2C	Source of FP (E2-Crimson, red); Gm ^R	(7)
pUCP30T-eYFP	pUCP-YFP	Source of FP (eYFP, yellow); Gm ^R	(7)
pUCP30T-GFPmut3	pUCP-GFP	Source of FP (GFPmut3, green); Gm ^R	(7)
pUCP20T-mOrange	pUCP-mOr	Source of FP (mOrange, orange); Amp ^R	(7)
pACQGm	pACQGm	Template for the T4 gene 32 terminators in the IBECGLOW cassette; Gm ^R , Tc ^R , Cm ^R	(8)
pEX-A-IBECGLOW	pEX-A-IBECGLOW	Carrier vector with the synthetic IBECGLOW cassette; Amp ^R	This work
pETS-IBECGLOW-Gm ^R	pETSg-IBECGLOW	Promoterless, reporterless, replicative carrier of the IBECGLOW cassette; Gm ^R (<i>aacC1</i>)	This work
pETS-IBECGLOW-Amp ^R	pETSg-IBECGLOW	Promoterless, reporterless, replicative carrier of the IBECGLOW cassette; Amp ^R (<i>bla</i>)	This work
pETS-IBECGLOW-Tc ^R	pETSg-IBECGLOW	Promoterless, reporterless, replicative carrier of the IBECGLOW cassette; Tc ^R (<i>tet</i>)	This work
pETS-IBECGLOW-Gm ^R	pETSg-IBECGLOW-PA-GFP	FP test, single RNR evaluation; GFPmut3 with class I RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
PnrdA(PAO1)_GFPmut3		FP test, single RNR evaluation; GFPmut3 with class II RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
pETS-IBECGLOW-Gm ^R	pETSg-IBECGLOW-PA-GFP	FP test, single RNR evaluation; GFPmut3 with class III RNR promoter (PA14); Gm ^R	This work
PnrdD(PA14)_GFPmut3		FP test, single RNR evaluation; eYFP with class I RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
pETS-IBECGLOW-Gm ^R	pETSg-IBECGLOW-PA-GFP	FP test, single RNR evaluation; eYFP with class II RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
PnrdA(PAO1)_eYFP		FP test, single RNR evaluation; eYFP with class III RNR promoter (PA14); Gm ^R	This work
pETS-IBECGLOW-Gm ^R	pETSg-IBECGLOW-PA-GFP	FP test, single RNR evaluation; mOrange with class I RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
PnrdD(PA14)_eYFP		FP test, single RNR evaluation; mOrange with class II RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
pETS-IBECGLOW-Gm ^R	pETSg-IBECGLOW-PA-GFP	FP test, single RNR evaluation; mOrange with class I RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
PnrdA(PAO1)_mOrange		FP test, single RNR evaluation; mOrange with class II RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
pETS-IBECGLOW-Gm ^R	pETSg-IBECGLOW-PA-GFP	FP test, single RNR evaluation; mOrange with class I RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
PnrdD(PA14)_mOrange		FP test, single RNR evaluation; mOrange with class II RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work

pETS-IBECGLOW-Gm ^R - <i>PnrdD</i> (PA14)-mOrange	pETSg-IBECGLOW-PA-GFP	FP test, single RNR evaluation; mOrange with class III RNR promoter (PA14); Gm ^R	This work
pETS-IBECGLOW-Gm ^R - <i>PnrdA</i> (PAO1)-E2-Crimson	pETSg-IBECGLOW-PA-GFP	FP test, single RNR evaluation; E2-Crimson with class I RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
pETS-IBECGLOW-Gm ^R - <i>PnrdJ</i> (PAO1)-E2-Crimson	pETSg-IBECGLOW-PA-GFP	FP test, single RNR evaluation; E2-Crimson with class II RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
pETS-IBECGLOW-Gm ^R - <i>PnrdD</i> (PA14)-E2-Crimson	pETSg-IBECGLOW-PA-GFP	FP test, single RNR evaluation; E2-Crimson with class III RNR promoter (PA14); Gm ^R	This work
pETS-IBECGLOW-Gm ^R - <i>PnrdJ</i> (PAO1)-mOrange	pETSg-IBECGLOW-PD-mOrange	FP test; mOrange with class II RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
pETS-IBECGLOW-Gm ^R - <i>PnrdD</i> (PA14)- <i>GFPmut3</i>	pETSg-IBECGLOW-PD-GFP	Single RNR evaluation; GFP with class III RNR promoter (PA14); Gm ^R	This work
pBAM-IBECGLOW-Gm ^R - <i>PnrdA</i> (PAO1)- <i>GFPmut3</i>	pBAM-IBECGLOW-PA-GFP	Double RNR evaluation; GFP with class Ia RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
pBAM-IBECGLOW-Gm ^R - <i>PnrdJ</i> (PAO1)- <i>GFPmut3</i>	pBAMg-IBECGLOW-PJ-GFP	Double RNR evaluation; GFP with class II RNR promoter (PAO1); Gm ^R	This work
pBAM-IBECGLOW-Gm ^R - <i>PnrdD</i> (PA14)- <i>GFPmut3</i>	pBAMg-IBECGLOW-PD-GFP	Double/triple RNR evaluation; GFP with class III RNR promoter (PA14); Gm ^R	This work
pUCP20T-IBECGLOW-Tc ^R - <i>PnrdA</i> (PAO1)-E2-Crimson	pUCP20t-IBECGLOW-PA_E2C	E2-Crimson with class Ia RNR promoter (PAO1); Tc ^R , Cb ^R	This work
pUCP20T-IBECGLOW-Gm ^R - <i>PnrdJ</i> (PAO1)-E2-Crimson	pUCP20g-IBECGLOW-PJ_E2C	E2-Crimson with class II RNR promoter (PAO1); Gm ^R , Cb ^R	This work

Strains			
<i>E. coli</i>			
DH5α	DH5α	<i>recA1 endA1 hsdR17 supE44 thi-1 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR Φ80dlacZM15</i>	Laboratory
<i>E. coli</i> DH5α		<i>E. coli</i> with pUCP20T:mCherry plasmid for the FP test.	Laboratory
pUCP20T:mCherry S17.1	S17.1	<i>recA thi pro hsdR- M+RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 Tpr Smr Xpir</i>	(1)
<i>P. aeruginosa</i>			
PAO1	PAO1 WT	Wild-type (ATCC 15692 / CECT 4122) - Spanish Type Culture Collection	Laboratory
PA14	PA14 WT		Laboratory
PAO1 eYFP		Wild Type with the eYFP FP cromosomically inserted.	Laboratory
PAO1 IBECGLOW-RNR(A) GFP		PAO1 IBECGLOW[<i>PnrdA</i> (PAO1): <i>GFPmut3</i>]:Tc ^R	This work
PAO1 IBECGLOW-RNR(J) E2C		PAO1 ::pUCP20T-IBECGLOW:[<i>PnrdJ</i> (PAO1): <i>E2-Crimson</i>]:Tn5;	This work
PAO1 IBECGLOW-RNR(D)		PAO1 IBECGLOW[<i>PnrdD</i> (PA14): <i>GFPmut3</i>]:Tn5; Gm ^R	This work
PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C		PAO1 ::pUCP20T-IBECGLOW[<i>PnrdA</i> (PAO1): <i>GFPmut3</i>] + IBECGLOW[<i>PnrdJ</i> (PAO1): <i>E2-Crimson</i>]:Tn5; Tc ^R , Gm ^R	This work
PAO1 IBECGLOW-RNR(J) mOrange		PAO1 ::IBECGLOW[<i>PnrdJ</i> (PAO1):mOrange]:Tn5; Gm ^R	This work

- de Lorenzo V, Cases I, Herrero M, Timmis KN. Early and late responses of TOL promoters to pathway inducers: identification of postexponential promoters in *Pseudomonas putida* with lacZ-tet bicistronic reporters. J Bacteriol. 1993;175(21):6902-7.

- 2 Sjöberg BM, Torrents E. Shift in ribonucleotide reductase gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* during infection. *Infect Immun*. 2011;79(7):2663-9.
- 3 Martínez-García E, Calles B, Arevalo-Rodríguez M, de Lorenzo V. pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC Microbiol*. 2011;11:38.
- 4 Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP. A broad-host-range F₁ Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene*. 1998;212(1):77-86.
- 5 Quenee L, Lamotte D, Polack B. Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *pseudomonas aeruginosa*. *Biotechniques*. 2005;38(1):63-7.
- 6 West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 1994;148: 81–86.
- 7 Barbier M, Damron FH. Rainbow Vectors for Broad-Range Bacterial Fluorescence Labeling. *PLoS One*. 2016;11(3):e0146827.
- 9 Schweizer HP, Hoang TT. An improved system for gene replacement and xylE fusion analysis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*. 1995;158(1):15-22.
- 10 Crespo A, Gavalda J, Julian E, Torrents E. A single point mutation in class III ribonucleotide reductase promoter renders *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inefficient for anaerobic growth and infection. *Sci Rep*. 2017;7(1):13350.

Supplementary Table S2. Primers and probes used in this study.

Primers		Sequence (5' -> 3')	Application
Number	Name		
1	M13 fw	GTTGTAACACGACGGCCAGT	Cloning control, colony PCR
2	M13 rv	CAGGAAACAGCTATGACC	Cloning control, colony PCR
3	pETS130-XbaI_fw	AATCTAGATGCCCATGGACGCACAC	pIBECGLOW construction, copying pETS130 backbone
4	pETS130-XbaI_rv	AATCTAGACGGGGAGGCAGACAAGGTATA	pIBECGLOW construction, copying pETS130 backbone
5	GmR-loxP_AatII_fw	AAAGACGTCGATCCATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT	Antibiotic resistance genes, gentamicin
6	GmR-loxP_AatII_rv	TATGACGTCTCTTCAGCTGTACAATTGGTACCATGG	Antibiotic resistance genes, gentamicin
7	TcR_AatII_fw	GACGTCTGAAGTCAGCCCCATACGA	Antibiotic resistance genes, tetracycline
8	TcR_AatII_rv	GACGTCCATGTTGTTGCTCAGGTCGC	Antibiotic resistance genes, tetracycline
9	CbR_AatII_fw	GACGTCAGGTGGCACTTTTC	Antibiotic resistance genes, carbenicillin/ampicillin
10	CbR_AatII_rv	GACGTCTAAGGGATTTTGGTCATGAGAT	Antibiotic resistance genes, carbenicillin/ampicillin
11	E2-Crimson_SacI_fw	AAAGAGCTCGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGC	Fluorescent reporters, E2-Crimson (red)
12	E2-Crimson_ApaI_rv	ATTGGGCCCTTACAATTCGTCGTCTGTAC	Fluorescent reporters, E2-Crimson (red)
13	eYFP_SacI_fw	AAAGAGCTCCTGAGCAAGGGCGAGGAG	Fluorescent reporters, YFP (yellow)
14	eYFP_ApaI_rv	ATTGGGCCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC	Fluorescent reporters, YFP (yellow)
15	GFPmut3_SacI_fw	AAAGAGCTCATGCGTAAAGGAGAAGAACTTTTCAC	Fluorescent reporters, GFP (green)
16	GFPmut3_ApaI_rv	ATTGGGCCCTTATTGTATAGTTCATCCATGCCATGTG	Fluorescent reporters, GFP (green)
17	mOrange_SacI_fw	AAAGAGCTCGGGAGCCACCATCACCATCACC	Fluorescent reporters, mOrange (orange)
18	mOrange_ApaI_rv	ATAGGGCCCGTACTGTTACTTGTACAGCTCGTCCATG	Fluorescent reporters, mOrange (orange)
19	PnrdA-PA_BamHI-fw	AGGATCCGAATTCTTGCTCCACACAGCCTC	RNR promoters, <i>P. aeruginosa</i> class Ia RNR
20	PnrdA-PA_SmaI-fw	ACCCGGGTTCTCGCGTGTGGTGTGC	RNR promoters, <i>P. aeruginosa</i> class Ia RNR
21	PnrdJ-PA_BamHI-fw	GGATCCCGCGCCAGCTGAAGG	RNR promoters, <i>P. aeruginosa</i> class II RNR
22	PnrdJ-PA_SmaI-fw	AACCCGGGGACTGCGTGCCTGTGC	RNR promoters, <i>P. aeruginosa</i> class II RNR
23	PnrdD-PA_BamHI-fw	AGGATCCCGCGACGCCCATTTTC	RNR promoters, <i>P. aeruginosa</i> class III RNR
24	PnrdD-PA_ClaI-fw	ATCGATTTCAACTTCTCCACAAC	RNR promoters, <i>P. aeruginosa</i> class III RNR

Supplementary Table S3. GLOW cassette, IBECGLOW plasmids and accession numbers from Genbank. The GLOW cassette, pBAM-IBECGLOW and pUCP20T-IBECGLOW plasmids were verified by sequencing. Sequences are available from the GeneBank under accession numbers.

Plasmid	Accession number (GenBank)
GLOW cassette	PP400727
pBAM-IBECGLOW-GmR-<i>PnrdA</i>(PAO1)-GFP<i>mut3</i>	PP429285
pBAM-IBECGLOW-GmR-<i>PnrdJ</i>(PAO1)-GFP<i>mut3</i>	PP429286
pBAM-IBECGLOW-GmR-<i>PnrdD</i>(PA14)-GFP<i>mut3</i>	PP429287
pUCP20T-IBECGLOW-TcR-<i>PnrdA</i>(PAO1) E2-Crimson	PP429288
pUCP20T-IBECGLOW-GmR-<i>PnrdJ</i>(PAO1) E2-Crimson	PP445033

Discusión

Los trabajos científicos presentados en la sección de "Resultados" en esta Tesis abordan aspectos clave para comprender la regulación génica del principal factor transcripcional que regula las diferentes clases de ribonucleotidil reductasas (RNR) presentes en *P. aeruginosa* PAO1. Nuestro estudio se ha centrado en discernir la red regulatoria de NrdR, teniendo a este como eje principal. Se ha investigado el efecto de diversos factores transcripcionales asociados a la regulación de NrdR en condiciones de crecimiento planctónico, formación de biofilm y mediante un modelo de infección utilizando *Galleria mellonella*.

Además, se ha desarrollado un innovador sistema para cuantificar la expresión génica mediante el uso de vectores combinados con proteínas fluorescentes como la GFP, entre otras.

No obstante, quiero destacar algunas investigaciones adicionales que no se detallan en el apartado de "Resultados" pero que se detallan en este apartado como importante para comprender la regulación transcripcional del gen *nrdR*. Estos trabajos comprenden el estudio de la regulación transcripcional de *nrdR* por DnaA en *E. coli* K12 MG1655 y una posible regulación génica de *nrdR* por el otro factor transcripcional, por el momento desconocido, en *P. aeruginosa*.

Regulación génica de NrdR mediante factores transcripcionales

En el capítulo 1 titulado "**FleQ controls gene expresión of *nrdR*, the master regulator of ribonucleotide reductases in *Pseudomonas aeruginosa***", se investiga la regulación transcripcional que ejerce en el principal factor transcripcional (NrdR) sobre la regulación transcripcional de las RNR de *P. aeruginosa* PAO1¹⁰². Comprender la dinámica de regulación inducida por factores transcripcionales en *nrdR* y observar su comportamiento en diferentes condiciones de crecimiento nos ayudará a entender cuál es la naturaleza de la regulación transcripcional del gen *nrdR*. Nosotros nos centramos en tres condiciones ambientales de crecimiento comúnmente utilizadas en nuestro laboratorio: el crecimiento planctónico, el crecimiento en un biofilm bacteriano en continuo y bajo una infección aguda en *G. mellonella*. Hay que mencionar que hasta el momento no tenemos como *nrdR* está regulado transcripcionalmente. En el trabajo de este capítulo, se ha identificado y caracterizado el mecanismo de regulación génica de FleQ sobre el gen *nrdR*.

FleQ es conocido como un factor transcripcional, similar a FleR²¹⁸, que está relacionado con la regulación de la expresión génica de genes flagelares presentes en *P. aeruginosa*²¹⁸. La importancia de FleQ sobre la regulación de genes flagelares es tal, que se ha visto que este se encuentra regulando la mayoría de los más de 40 genes involucrados en este sistema en esta bacteria²¹⁹.

Hasta el momento, se ha demostrado que FleQ puede activar genes de dos maneras distintas. La primera implica la unión de FleQ aguas arriba del sitio de unión de la ARN polimerasa (mediante el factor σ^{54}) en promotores de genes flagelares como *fleSR*, mientras que la segunda implica la unión aguas abajo del sitio de unión de la ARN polimerasa (genes como *flhA*, *fliE* y *fliL*)²¹⁸, tal y como se muestra en la **Figura 19A-B**. El primer caso corresponde al tipo conocido como “NtrC-like”, que se basa en la activación génica a distancia mediante el uso de loopings^{220,221} (**Figura 19A**). En el segundo caso, FleQ se encuentra físicamente relacionado con la ARN polimerasa para activar la transcripción génica, pero no usa ningún looping sino una interacción directa a la RNA polimerasa (**Figura 19B**).

Independientemente de la manera en la que FleQ regule a los genes flagelares, este regulador está supeditado a su actividad ATPasa, la cual es necesaria para modular el complejo formado por la ARN polimerasa, activando o inactivando así la transcripción génica²²². Además, FleN es considerado un factor anti-sigma que actúa después de la transcripción modulando la acción de FleQ. Concretamente, este factor anti-sigma se une a la región ATPasa de FleQ y la bloquea, reduciendo así la activación transcripcional mediada por FleQ (**Figura 19C**)^{223,224}.

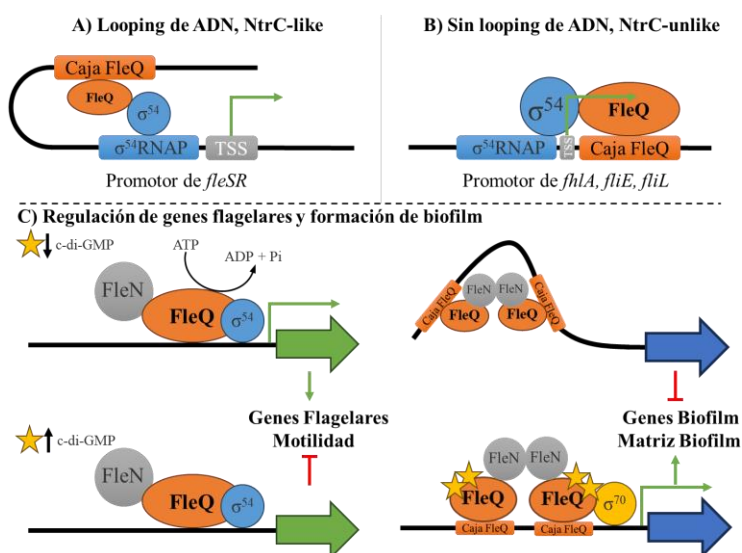


Figura 19: Funcionamiento de la regulación mediada por FleQ. Figura adaptada de ²¹⁸.

Cuando se analiza el papel de la regulación mediada por FleQ y su estrecha relación con el mensajero secundario c-di-GMP, sintetizado por las diguanilato ciclasas (DGCs)²²⁵, se observa que esto puede explicarse mediante las concentraciones intracelulares de c-di-GMP que se encuentran en un momento determinado en el interior celular bacteriano. Se ha observado que, en condiciones planctónicas, los niveles de c-di-GMP son relativamente bajos, mientras que en condiciones formadoras de biofilm (o en un biofilm maduro) estos niveles son considerablemente más altos^{226,227}. Tal como se muestra en la **Figura 19C**, en condiciones de bajos niveles de c-di-GMP, FleQ actúa activando genes flagelares como *pel*, permitiendo así la motilidad celular planctónica. Sin embargo, bajo estas condiciones, los genes para la formación de biofilm están reprimidos^{218–220,227}. Esta situación cambia completamente cuando hay una alta concentración de c-di-GMP, comúnmente alcanzadas en condiciones de crecimiento en forma de biofilm. Este incremento en el c-di-GMP intracelular es debido al papel que desempeñan factores como AmrZ al activar genes de síntesis de alginato y DGCs, y al reprimir genes como *psl*²¹⁸. Esto último conduce a la activación de la expresión de genes implicados en la síntesis de la matriz del biofilm y a la represión de genes que promueven la motilidad celular (**Figura 19C**)²¹⁸.

En este trabajo hemos identificado la potencial asociación entre el regulador transcripcional de las RNR, *nrdR*, y el regulador transcripcional de genes flagelares FleQ justificada por el papel que desempeña FleQ en la transición de un estado planctónico a uno con en forma de biofilm. Para nuestro grupo, la capacidad de FleQ para modular su función en la expresión génica en función de la presencia o ausencia del mensajero secundario c-di-GMP explica esta conexión. Este mensajero secundario (c-di-GMP) actuaría como una señal para que FleQ modifique no sólo la dinámica en los genes flagelares y de biofilm, sino que también está implicado en el papel que efectúa *nrdR*. Las RNR son enzimas altamente reguladas por mecanismos alostéricos y transcripcionales (explicados en la introducción de esta tesis). El papel represor de *nrdR* es crucial cuando la demanda de nucleótidos es baja, donde las RNR deben estar reprimidas en cierta medida, como es en el caso de la formación de biofilms¹⁰² donde la demanda de nucleótidos es significativamente más bajo. Dada la importancia de la regulación de genes relacionados con la motilidad bacteriana (esencial para la invasión y movilidad de la bacteria)^{172,174,228}, nos planteamos la posibilidad de que FleQ no solo esté implicado en aspectos de motilidad, sino que también podría determinar el balance total de nucleótidos disponibles mediante la regulación indirecta de las RNR. Esto se lograría a través de la regulación directa de *nrdR* por parte de FleQ, tal y como lo demuestran en los resultados obtenidos en el **capítulo 1 de esta tesis**. Todo esto estaría supeditado por el estado de crecimiento de

la bacteria y de las condiciones en las que se encuentra, ya sea en crecimiento planctónico/infección aguda o formando un biofilm bacteriano.

En nuestro estudio, se tomó en consideración todo lo mencionado anteriormente y se utilizó el gen *pelA* como control positivo para la regulación del factor transcripcional FleQ²²⁷. Sorprendentemente, demostramos experimentalmente que la regulación de *nrdR*, por parte de FleQ, es similar a la que encontramos en el propio gen *pelA*^{218,229}.

En primer lugar, quisimos determinar y posicionar el sitio de inicio de la transcripción (TSS) de *nrdR*. Gracias a técnica 5'-RACE, se determinó que se encontraba a -28 pb respecto al codón de inicio de la traducción (ATG) del propio gen, independientemente si la bacteria estaba creciendo en condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Figura 1 y Figura Suplementaria S2 capítulo 1). Esto proporcionó una primera aproximación sobre cómo este gen se encuentra regulado bajo diferentes condiciones oxigénicas. Además, estudios previos ya habían predicho este mismo nucleótido, lo que refuerza nuestros resultados²³⁰.

Posteriormente, realizamos una búsqueda bioinformática de posibles factores transcripcionales relacionados con la regulación transcripcional de *nrdR*. Para ello, utilizamos la herramienta "Virtual Footprint" proporcionada por PRODORIC²³¹. Esta herramienta permite predecir qué factores transcripcionales podrían tener cajas de unión dadas ciertas matrices de peso en una secuencia promotora. Por lo tanto, sólo se seleccionaron todas aquellas matrices de peso asociadas a factores transcripcionales correspondientes a *P. aeruginosa*. El resultado fue la identificación de 7 posibles secuencias correspondientes a 4 factores transcripcionales (FleQ, LasR, NarL y RhlR) (Figura 1 capítulo 1). Nuestro grupo ya había predicho y demostrado anteriormente la presencia de las dos cajas NarL en el promotor de *NrdR*, una de ellas localizada en la región -10 del propio gen (Figura 1D capítulo 1)¹⁰². Las hipotéticas cajas RhlR y LasR fueron descartadas, ya que al utilizar la cepa isogénica *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta lasI/rhlI$ observamos que la expresión génica de *nrdR* no se encontraba alterada cuando usábamos el promotor salvaje de nuestro gen de interés (Figura Suplementaria 4 capítulo 1).

Una vez obtuvimos la primera aproximación mediante herramientas bioinformáticas, decidimos llevar a cabo un ensayo para determinar específicamente que proteínas están asociadas a este promotor. Los experimentos de Pull-down con nanopartículas magnéticas tenían unida estreptavidina para aislar los promotores con las proteínas unidas al promotor. Para atrapar los factores transcripcionales de *nrdR*, utilizamos una sonda de ADN que contenía el promotor de este gen repetido por triplicado en tándem y marcado con biotina en su extremo 5'. Esto último nos permitió más adelante recuperar todo lo que se pudiera unir a la sonda de ADN mediante las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con estreptavidina. En el experimento utilizamos dos tipos de extractos crudos de *P. aeruginosa* PAO1, uno

correspondiente a la fase exponencial y otro correspondiente a la fase estacionaria del crecimiento de la bacteria, ya que determinamos que nuestro gen no se expresa de forma continua durante todo el ciclo celular (Figuras 3, 4 capítulo 1). El patrón de proteínas obtenidos en un gel de poliacrilamida era muy similar entre la fase exponencial y la fase estacionaria (Figura 2 capítulo 1). Por lo tanto, decidimos recuperar solo las bandas que presentaban una mayor intensidad (todas correspondientes a la fase estacionaria) y se analizaron por espectrofotometría de masas (Figura 2 capítulo 1). Aunque se obtuvieron muchos resultados (*hits*) de posibles factores transcripcionales asociados a las bandas proteicas analizadas, observamos la presencia de FleQ en tres de ellas, y en las que coincidía por peso molecular, lo que corroboraba el resultado bioinformático previo. Además, también identificamos NarL en bandas que correspondían en peso molecular con la propia proteína. Esto nos confirmó la robustez de los resultados obtenidos con esta técnica.

Una vez identificada la caja de unión a FleQ y la posterior confirmación de su unión en el promotor de *nrdR* de *P. aeruginosa* PAO1 mediante una aproximación proteómica, realizamos estudios transcriptómicos *in vitro* e *in vivo*. Estos experimentos nos permitieron observar, identificar y demostrar cuál era el papel de FleQ en la expresión génica de *nrdR*. La cepa isogénica de *P. aeruginosa* que contenía la delección del gen *fleQ* presentaba una disminución en el crecimiento de esta a lo largo del tiempo (Figura 3A capítulo 1). Esta disminución se producía independientemente de las condiciones oxigénicas que se le aplicaran durante el crecimiento planctónico. Mediante técnicas de RT-PCR, pudimos observar que las cepas mutantes para el gen *fleQ* presentaban una menor expresión de *nrdR* durante todo el ciclo celular de la bacteria (Figura 3B capítulo 1). Ello sugiere que *fleQ* se encuentra regulando *nrdR* en ambas condiciones oxigénicas y durante todo el crecimiento planctónico de la bacteria.

Ahora solo quedaba por ver qué sucedía en la expresión de *nrdR* cuando modificábamos la caja de unión a FleQ localizada en el promotor *PnrdR*. Para ello usamos condiciones *in vitro*, aplicando ensayos de gen reportero (fusiones transcripcionales) en cultivos planctónicos de *P. aeruginosa*, e *in vivo* en una infección aguada en el modelo animal de *G. mellonella* o mediante crecimiento en forma de biofilm tanto estático como en continuo. En condiciones planctónicas, pudimos observar cómo la modificación de este sitio de unión de FleQ reducía la expresión de *nrdR* tanto en fase exponencial como estacionaria, siendo esta reducción más pronunciada en fase estacionaria (Figura 4 capítulo 1). También quisimos ver el papel que ejercía la alarmona c-di-GMP bajo estas condiciones. La adición de c-di-GMP provocó un aumento en los niveles de expresión de *nrdR* significativamente, tal y como sucedió con el gen control *pelA* (Figura 5 capítulo 1). Con todo esto llegamos a la conclusión de que el efecto del c-di-GMP influye en la regulación de *nrdR* mediada FleQ. Aun así, esperábamos una mayor significancia entre la cepa con el

promotor salvaje y la cepa con el promotor mutado. Sin embargo, los niveles de c-di-GMP son mucho más altos cuando *P. aeruginosa* se encuentra formando un biofilm bacteriano^{218,227,229} y este hecho podría ser el justificante de los valores de expresión obtenidos. Por ello, realizamos experimentos *in vivo* que implicaban la formación de un biofilm maduro, tanto en estático como en forma continua de medio de cultivo. El resultado de la expresión de *nrdR* en condiciones formadoras de biofilm fue totalmente opuesto al que se pudo observar en condiciones planctónicas o de infección. Aquí FleQ se comportó claramente como un represor (Figura 6, 7 capítulo 1). Dado el papel ambivalente de FleQ sugerimos que, en estas condiciones este factor transcripcional, en presencia de niveles altos de c-di-GMP reprime la expresión de *nrdR*. Además, sugerimos que debido a la similitud con el comportamiento que presenta con la segunda caja de unión a FleQ presente en el promotor de *pelA*, puede haber una segunda caja FleQ en el promotor de *nrdR* por determinar aunque en nuestras predicciones no lo hemos podido identificar.

Finalmente, también estudiamos la expresión *in vivo* de *nrdR* cuando *P. aeruginosa* infecta a *G. mellonella* de forma aguda (Figura 8 capítulo 1). En este experimento observamos que FleQ se encuentra activando a *nrdR*. La imposibilidad por formar un biofilm maduro durante las 18 h que duró el experimento posiblemente condicionara el experimento. Todo y con eso, los resultados sugieren que estamos delante del mismo escenario al que nos enfrentamos cuando queremos estudiar el papel de FleQ en *nrdR* bajo un crecimiento planctónico.

En general, gracias a este estudio hemos obtenido una mayor comprensión del mecanismo regulatorio de NrdR y identificado por primera vez un nuevo regulador de este gen. Esto nos ha permitido obtener una visión más amplia sobre cómo se regulan las RNR, de forma indirecta. Además, podemos constatar que las condiciones bajo las cuales *nrdR* se encuentra afectado transcripcionalmente son determinantes a la hora de estudiar su expresión (Figura 9 capítulo 1). No obstante, gracias al ensayo Pull-Down, se ha abierto un nuevo horizonte del que se puede tener una base para futuros estudios que ayuden a entender, de forma más profunda, la regulación de NrdR.

Un nuevo factor transcripcional hipotético en la regulación de *nrdR* en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Después de demostrar el papel de FleQ en la regulación de *nrdR* en *P. aeruginosa* (Capítulo 1), se identificó una posible caja de unión para un nuevo regulador transcripcional utilizando la herramienta bioinformática Virtual Footprint de ProDoric2, la cual recientemente actualizo su base de datos considerablemente. Esta caja (TTGTCGCGCTTCGC) se encuentra localizada entre 140-126 pb respecto al codón de inicio ATG del gen *nrdR*. Además, esta secuencia presenta similitud con 128

los sitios de unión de los factores transcripcionales Anr y Vfr, y según la información proporcionada por Virtual Proditor2.

En la **Figura 20** se muestran la variación en la expresión génica de *nrdR* tras la mutación específica de la secuencia original por CGATATGCATGGA. Inicialmente, se analizó la expresión génica en condiciones aerobias y anaerobias (**Figura 20A-B**). En ambas condiciones, la mutación tuvo un efecto represor sobre la expresión de *nrdR*. Esto nos llevó a descartar a Anr como el regulador transcripcional asociado a esta caja, dado que Anr se expresa exclusivamente bajo condiciones de crecimiento anaerobias²¹⁶. Por lo tanto, se consideró a Vfr como un posible regulador, ya que su expresión no es está restringida a condiciones anaeróbicas²¹⁷. Sin embargo, al emplear la cepa isogénica *P. aeruginosa* PAO1 Δvfr , no se observaron diferencias en la expresión de *nrdR* en comparación con la cepa silvestre (datos no mostrados), descartando también a Vfr como el regulador transcripcional del *nrdR*.

A pesar de no haber identificado aún el factor transcripcional asociado a esta secuencia, se evaluó el impacto de este regulador hipotético en condiciones de formación de biofilm y en un modelo de infección con *G. mellonella*, similar a lo estudiado anteriormente en FleQ. Sorprendentemente, este nuevo regulador transcripcional mostró un comportamiento similar a FleQ, aunque con un efecto mucho más pronunciado (**Figura 20C-F**). En condiciones planctónicas y durante la infección en *G. mellonella*, el regulador transcripcional actuó como activador, ya que la mutación en su sitio de unión disminuyó la expresión de *nrdR* (**Figura 20A-C**). Por el contrario, en condiciones de biofilm, este regulador actuó como represor; la mutación de su sitio de unión provocó un aumento en la expresión de *nrdR* durante el crecimiento en forma de biofilm (**Figura 20D-F**).

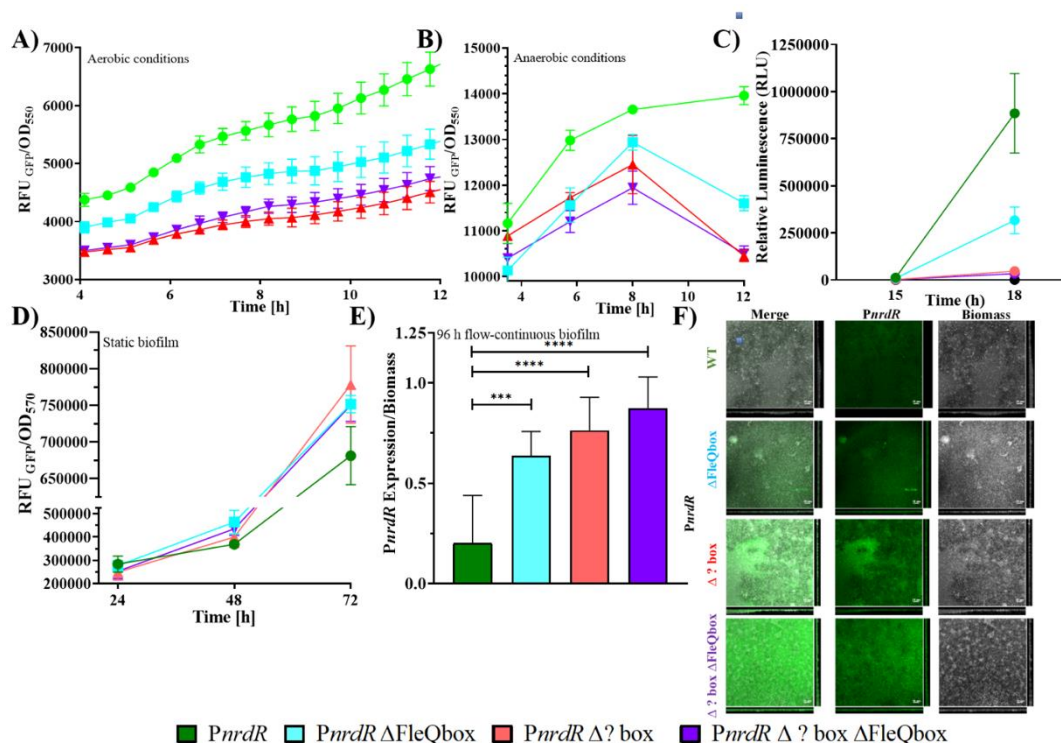


Figura 20: Expresión transcripcional de *nrdR* y mutagénesis dirigida de las cajas hipotéticas para un factor transcripcional aún no identificado en *P. aeruginosa* PAO1. A) Ensayos de genes reporteros en condiciones planctónicas aerobios y B) en condiciones anaeróbicas. C) Ensayos en *G. mellonella* como modelo de infección. D) Expresión génica bajo condiciones de formación de biofilm en estático y E) en flujo continuo. F) Imágenes de microscopía confocal del biofilm en flujo continuo.

DnaA como posible regulador transcripcional de *nrdR* en *E. coli* K12 MG1655.

Paralelamente al estudio transcripcional del gen *nrdR* en *P. aeruginosa* PAO1, se analizó el gen ortólogo presente en *E. coli* K12 MG1655. Para ello, se realizaron dos aproximaciones diferentes. La primera, basada en la búsqueda en la base de datos de expresión genética global - *GEO Profiles* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/>) y la segunda en la aplicación de ensayos de expresión génica mediante la utilización de fusiones transcripcionales.

En la búsqueda en la base de datos GEO se trató de identificar cuáles eran los procesos, o factores transcripcionales involucrados en su expresión, en los que la expresión génica de *nrdR* podría verse afectada. El resultado fueron 4 posibles

condiciones que modificaban los valores observados en la base de datos *GEO Profiles*. Los factores identificados fueron la osmolaridad (*GEO Profiles* ID: 56481309), la novobiocina (*GEO Profiles* ID: 35612013) y el estrés oxidativo (*GEO Profiles* ID: 5410434). Además, quisimos incluir la hidroxiiurea por su papel en la regulación de la clase I de las RNR²¹³. Para la segunda aproximación y para corroborar los resultados *in silico* se utilizó el promotor de *nrdR* fusionado transcripcionalmente a la GFP como gen reportero.

En primer lugar, como se puede observar en la **Figura 21**, la expresión del gen *nrdR* de *E. coli* sigue perfectamente el ciclo celular bacteriano incrementando su expresión al final de la fase exponencial y disminuyendo está en la fase estacionaria. Este comportamiento es diferente al observado en la expresión del gen *nrdR* de *P. aeruginosa* que no sigue un patrón de expresión dependiente del ciclo celular.

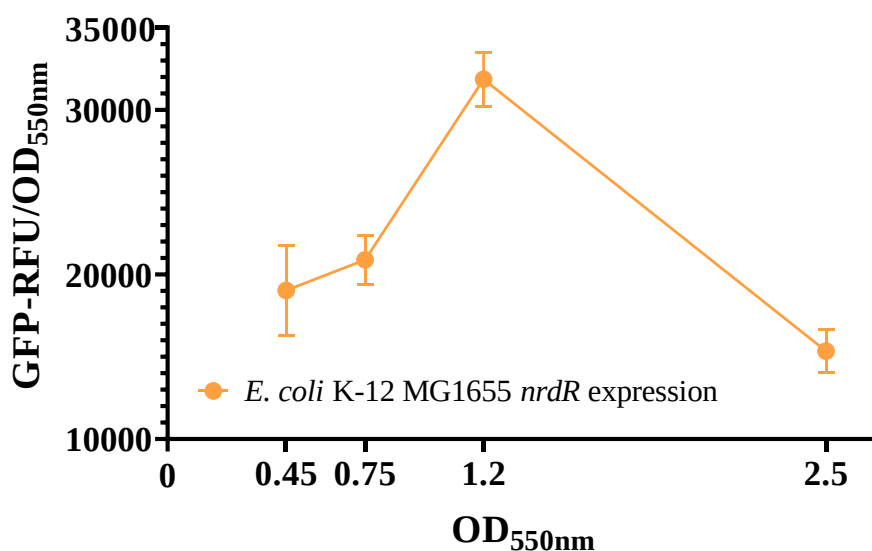


Figura 21: Expresión transcripcional del gen *nrdR* de *E. coli* K-12 MG1655 sigue el ciclo celular.

Posteriormente y para poder corroborar los resultados identificados en la base de datos *GEO Profiles*, se estudió la expresión bajo las siguientes condiciones de crecimiento:

- **Osmolaridad:** Se utilizaron tres condiciones de NaCl: hipoosmolaridad (0 mM NaCl), normoosmolaridad (170 mM NaCl) e hiperosmolaridad (500 mM NaCl).
- **Novobiocina:** Se testó a una concentración de 50 µg/ml.

- **Hidroxiurea:** Se testó a una concentración de 10 mM.
- **Estrés oxidativo:** Se testó con 2 mM de H₂O₂.

En condiciones anormales de osmolaridad (hiper- e hipo-osmolaridad) y estrés oxidativo (H₂O₂) no se observaron cambios significativos en la expresión génica de *nrdR* en *E. coli* (datos no mostrados). Sin embargo, la hidroxiurea y la novobiocina sí indujeron cambios estadísticamente significativos en la expresión génica de *nrdR*, específicamente a una O.D.₅₅₀ de 0.45 y de 1.2 para la novobiocina, y de O.D.₅₅₀ de 0.75 para la hidroxiurea (Figura 23A-B). Con estos resultados, quisimos estudiar cuáles eran los mecanismos moleculares que indicases por que la novobiocina y la hidroxiurea podrían variar el patrón de expresión del factor transcripcional *nrdR* de *E. coli*. La novobiocina actúa a nivel de la replicación del ADN, inhibiendo su replicación ya que interactúa con la ADN girasa que altera la abertura de la hebra del ADN e impidiendo la replicación²¹⁴. Por otro lado, la hidroxiurea inhibe la actividad enzimática de la RNR de clase I²¹³, estableciendo una relación indirecta con nuestro regulador.

En base de estos resultados, se hipotetizó que un posible regulador transcripcional de *nrdR* en *E. coli* podría estar acoplado al ciclo celular bacteriano o en la replicación del ADN, puesto que la hidroxiurea y la novobiocina son dos compuestos que modifican ambos procesos celulares.

Tal y como se procedió con el estudio transcripcional de *nrdR* en *P. aeruginosa*, se realizó una búsqueda bioinformática de las posibles cajas de unión de factores transcripcionales asociados a *E. coli* K12. Para ello, se usó el promotor *PnrdR*, identificándose varios posibles candidatos, como por ejemplo DnaA, Lrp, etc (ver Figura 22C). Observando estos resultados, nos centramos en estudiar DnaA, la proteína iniciadora de la replicación bacteriana²¹⁵, ya que cumple con las premisas de nuestra hipótesis. Identificamos mediante el análisis bioinformático tres posibles sitios de unión de DnaA en el promotor de *nrdR*. Además, estudios previos describieron sitios de unión de DnaA en el promotor de genes *nrd*⁹², lo que corrobora nuestra aproximación que esta proteína era una buena candidata para ser un regulador transcripcional del gen *nrdR* en *E. coli*.

Posteriormente, se decidió modificar la secuencia de dos de las cajas identificadas por PRODORIC2 (Figura 22C) para su posterior uso en ensayos de gen reportero. Sin embargo, la tercera caja localizada en la región más próxima al ATG del gen *nrdR* fue descartada, ya que esta región suele albergar represores génicos, y los resultados obtenidos con la novobiocina o la hidroxiurea (Figura 22A-B) concordaban más con un efecto activador.



Figura 22: Región promotora del gen *nrdR* en *E. coli* K-12 MG1655 e identificación bioinformática de factores transcripcionales asociados a su promotor. A) Promotor del gen *nrdR* y localización de las cajas DnaA identificadas por PRODORIC2. B) Cebadores usados para la mutagénesis de las cajas DnaA 2 y 3. C) Tabla resultado de las matrices de peso (PWM) obtenidas mediante la herramienta Virtual Footprint de PRODORIC2.

En los ensayos experimentales de gen reportero se usaron las diferentes versiones de los promotores de *nrdR* de *E. coli* con las secuencias de los sitios de unión de DnaA por separado o de forma conjunta. La mutagénesis de una de las cajas (DnaA Box 1 o DnaA Box 2), independientemente de cuál fuese, disminuyó significativamente la expresión del gen *nrdR* (Figura 23C). El efecto más significativo se observó al mutar ambas cajas (DnaA Box 2-3), disminuyendo la expresión génica de *nrdR* prácticamente a un valor nulo (Figura 23C). Estos resultados confirmaron que ambas cajas tienen una importancia crítica en la expresión génica de *nrdR*. Asimismo, la modificación de ambas en el promotor *Pnrdr* de *E. coli* K12 MG1655 disminuye significativamente la expresión asociada a este viéndose también alterado aparentemente la dependencia al ciclo celular cuando las cajas DnaA están mutadas.

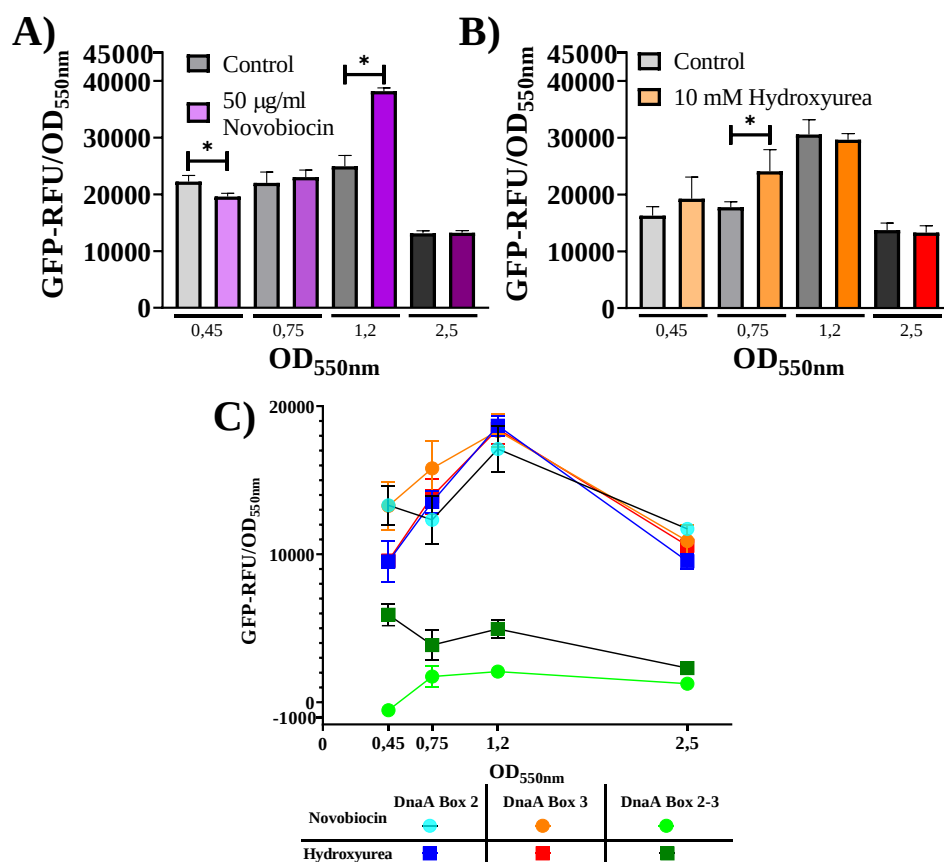


Figura 23: Expresión transcripcional del gen *nrdR* de *E. coli* K-12 MG1655. A y B) Ensayos de gen reportero (GFP) fusionando transcripcionalmente al promotor salvaje del gen *nrdR*. En gris se representan los valores de expresión obtenidos de la cepa salvaje sin aplicar novobiocina o hidroxiqurea. En violeta los resultados obtenidos de aplicar la novobiocina y en naranja/rojo los obtenidos al aplicar la hidroxiqurea. C) Ensayos de gen reportero usando los promotores con mutagénesis dirigida a las cajas de unión de DnaA (cajas 2 y 3) localizadas en el promotor de *nrdR*. El asterisco representa diferencia estadística (*t*-test) con $p < 0.05$.

Con todos estos resultados procedimos a obtener a purificar la proteína DnaA en forma soluble. Esta nos permitiría realizar estudios de análisis de cambio de movilidad electroforética (EMSA) en los que se evaluaría específicamente la interacción de DnaA a la región promotora de *PnrdR* de *E. coli*. Sin embargo, no se pudo obtener la proteína DnaA en estado soluble ya que en todos los procesos de

sobreproducción de esa proteína forma cuerpos de inclusión, es decir, en forma insoluble.

Tal y como realizamos en *P. aeruginosa*, decidimos ver el efecto concreto de las mutaciones producidas en las diferentes cajas de DnaA identificadas utilizando un modelo de infección aguda en el organismo modelo *G. mellonella*. Sin embargo, los plásmidos utilizados en el laboratorio para reportar la expresión mediante luminiscencia (genes *lux*) no proporcionaron una señal óptima para la monitorización de *nrdR* en diversas cepas de *E. coli*, incluida *E. coli* K12 MG1655 o la uropatógena CFT073.

Diseño y desarrollo de una batería de vectores que presentan un casete sintético para la monitorización de la expresión génica en bacterias

En el capítulo 2, titulado “**Novel Fluorescent Reporter Vectors for Monitoring Bacterial Promoter Activity under different environmental condition**”, desarrollamos una nueva metodología en la que se utilizan diferentes proteínas fluorescentes (PF) en un constructo sintético denominado GLOW, para la monitorización de la expresión génica bacteriana bajo condiciones ambientales dinámicas y diferenciadas.

Los procesos bacterianos son modulados por la expresión génica, la cual se encuentra regulada por las condiciones ambientales. Por lo tanto, entender como influyen varios parámetros ambientales en el fenotipo bacteriano es esencial¹⁷⁵. Para ello, el uso de genes reporteros como las PF, junto a la ingeniería genética mediante el uso de metodologías en las que se usan promotores génicos es esencial para entender los cambios de expresión génica en las bacterias. Además, este tipo de metodología es crítica para facilitar la investigación en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, gracias a su naturaleza no invasiva^{177,178}.

En la **Figura 1 del capítulo 2**, podemos ver cuál es la estructura general que sigue el casete que hemos denominado GLOW. De forma resumida, se utilizaron terminadores tanto transcripcionales como traduccionales para evitar el posible ruido de fondo generado en la transcripción de las PF. Este casete de ADN fue específicamente diseñado para albergar tres módulos modificables mediante el uso combinado de enzimas de restricción. El primer módulo se corresponde al lugar de inserción de una secuencia promotora (Prom.) a estudiar. El segundo se usa para la inserción de una PF, módulo (FP), que se encuentra transcripcionalmente controlada por el promotor que queremos estudiar del módulo anterior. Finalmente, el tercer

módulo, el (R), permite la inserción de un gen que codifica para una resistencia bacteriana junto a su respectivo promotor. Además, entre el módulo Prom. y el módulo FP se encuentra una región que codifica para una versión más corta de la cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*). Esta última sirve para añadir su codón de STOP y así crear la fusión transcripcional entre el promotor deseado y la PF sin que haya interferencia en la actividad final de esta.

El uso del sistema GLOW ofrece numerosas ventajas, ya que es un sistema en el que, de forma sencilla, se usan enzimas de restricción comúnmente usadas en los laboratorios y que no presentan un coste elevado. Además, la modificación de los módulos se puede realizar de forma efectiva y gracias a los cebadores universales M13 se puede comprobar rápidamente que su secuencia es correcta ya sea mediante secuenciación o PCR. Otra ventaja de este sistema es su capacidad para obtener múltiples versiones de un mismo plásmido/casete, ya que con uno o dos pasos de clonaciones es suficiente para sintetizar el plásmido final y de esta manera poder medir la expresión génica de un determinado gen a estudiar. Igualmente, nuestro sistema no es incompatible con otros genes reporteros, como la β -galactosidasa, debido a que la metodología de uno u otro no interviene fenómenos métricos similares (quimioluminiscencia para la PF y químico para X-gal). La combinación entre el casete GLOW y el plásmido pETS-130, ampliamente utilizado en nuestro laboratorio, garantiza su uso en cepas como *E. coli* DH5 α o en otras que presenten compatibilidad con el origen de replicación de los plásmidos utilizados. La versatilidad del sistema facilita el diseño de una amplia variedad de vectores que permiten el estudio de manera rápida o como prueba de concepto. Esta característica es crítica para muchos diseños experimentales y nuestro sistema la presenta, ya que con solo cambiar el promotor génico a estudiar podemos tener monitorizada la expresión génica del gen de interés en días. Todo y que nuestro estudio se ha basado en la monitorización de genes mediante PF, también se pueden realizar otro tipo de estudios. Por ejemplo, se puede sustituir la PF por genes de proteínas acoplados a un PF (fusión traduccional) para monitorizar espacialmente la proteína de interés (intra o extracelularmente).

Sin embargo, el uso del casete GLOW también presenta algunas limitaciones. Es importante considerar el plásmido utilizado, ya que la incompatibilidad entre éste y la cepa receptora podría ocasionar una lectura errónea de la fluorescencia emitida. Además, las PF utilizadas deben de ser compatibles con la cepa bacteriana empleada. Por ejemplo, al basarnos en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 para la demostración práctica del sistema, descubrimos que al utilizar el espectro de absorción/emisión para las PF de color cian (eCFP) (datos no aportados) o naranja (mOrange), los valores de fluorescencia obtenidos eran completamente erróneos, por lo que ambas PF tuvieron que ser descartadas. También es crucial considerar la fluorescencia máxima que puede captar y emitir una FP una vez que se la excita mediante un láser, ya que puede afectar a la integridad y a la propia fluorescencia de la proteína.

Para evaluar el casete GLOW, en nuestro caso estudiamos y analizamos la expresión de los promotores de *P. aeruginosa* PAO1, (*PnrdA* y *PnrdJ*) y uno de *P. aeruginosa* PA14 (*PnrdD*), correspondientes a los genes que codifican para las distintas clases de ribonucleotide reductasa (RNR) (clase I, clase II y clase III) codificadas en el genoma de *P. aeruginosa*. La **Figura 2 del capítulo 2** muestra la validación de nuestro sistema mediante la observación en un microscopio invertido de fluorescencia, tanto para su uso en *E. coli* como en *P. aeruginosa*. En estas imágenes de microscopía, observamos que las diferentes PF utilizadas (GFP*mut3*, eYFP, mOrange y E2-Crimson) funcionan y emiten correctamente bajo la expresión de los tres promotores de las distintas RNR estudiadas (*PnrdA*, *PnrdJ* y *PnrdD*) en *E. coli* (**Figura 2A capítulo 2**). Además, gracias a la prueba de compatibilidad y de emisión cruzada entre las diferentes proteínas fluorescentes estudiadas (**Figura 3 capítulo 2**), pudimos determinar que la mejor combinatoria entre dos PF es GFP*mut3* junto a E2-Crimson.

En la **Figura 2B del capítulo 2**, podemos observar que al analizar la fluorescencia de la cepa PAO1 IBECGLOW-RNR(A) GFP (que presenta la PF GFP*mut3* bajo el control del promotor *PnrdA*) no tenemos señal de E2-Crimson, y que la cepa PAO1 IBECGLOW-RNR(J) E2C (que presenta la PF E2-Crimson bajo el control del promotor *PnrdJ*) no presenta señal de fluorescencia GFP*mut3*. Esto implica que no hay una emisión cruzada “*crosstalk*” entre las diferentes PF. Sólo la cepa PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C, que presenta los dos casetes con las respectivas proteínas fluorescentes bajo el control de sendos promotores, es capaz de proporcionar una señal de ambas proteínas fluorescentes simultáneamente (**Figura 2B3 capítulo 2**).

Las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 que presentaban el casete GLOW, ya sea mediante inserción cromosómica o mediante un plásmido, se sometieron a diferentes pruebas y experimentos para evaluar la efectividad del casete y sistema GLOW bajo condiciones dinámicas de crecimiento bacteriano. Se utilizaron condiciones oxigénicas cambiantes para simular condiciones *in vitro* y condiciones formadoras de biofilm para simular condiciones *in vivo*. En el primer caso, se analizó la fluorescencia cada 30 min de GFP*mut3* y de E2-Crimson bajo condiciones aeróbicas (21% O₂) o en condiciones anaeróbicas (0.1% O₂). Cuando se aplicaron condiciones aeróbicas, se pudo observar que la fluorescencia de la cepa controlada por el promotor de clase I (*PnrdA*) era más elevada comparándola con la emisión generada en los vectores bajo en control de los promotores de las RNR de clase II (*PnrdJ*) o clase III (*PnrdD*) (**Figura 3 capítulo 2**). Por otro lado, al desarrollar y generar condiciones anaeróbicas, la expresión de las proteínas fluorescentes de los promotores controlados por las RNR de clase II y de clase III se vieron aumentadas su expresión comparando con la observada en la RNR de clase I (**Figura 3 capítulo 2**). Ambos comportamientos ya habían sido demostrados y corroborados extensamente por nuestro grupo de

investigación en anteriores trabajos ^{71,102}, reforzando así los resultados obtenidos durante los experimentos en los que usamos el sistema GLOW.

En el segundo caso, se evaluó la fluorescencia *in vivo* emitida de las cepas que estaban creciendo en forma de biofilm. Además, se utilizaron dos técnicas diferentes para el estudio de estos biofilms para asegurar su veracidad. La primera técnica estaba basada en la formación de un biofilm en condiciones estáticas (**Figura 5 capítulo 2**) y, la segunda, bajo condiciones donde se aplica un flujo continuo de medio de cultivo (**Figura 6 capítulo 2**). En estas condiciones estáticas, la medida de quimioluminiscencia se realizaron cada 24 h y se corrigió con la biomasa celular (OD_{570nm}) obtenida por tinción con cristal violeta. Observamos que la cepa PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C, que presenta la doble combinación de promotor-FP (*PnrdA_GFPmut3* + *PnrdJ_E2-Crimson*) presentó una paulatina disminución de la fluorescencia emitida por *GFPmut3* hasta las 72 h y una estabilización de la fluorescencia asociada al promotor de la RNR de clase I. La fluorescencia emitida por E2-Crimson, controlada por el promotor de la RNR de clase II, mantuvo una dinámica de crecimiento exponencial durante las 96 h que duró el experimento. Ambos comportamientos también habían sido observados por nuestro grupo de investigación anteriormente⁷¹.

Por otro lado, se utilizó la misma cepa, PAO1 IBECGLOW-RNR(A+J) GFP-E2C, en un flujo continuo de medio de cultivo. Decidimos aplicar un sistema donde el biofilm bacteriano se generaba sobre el soporte conocido como *flow-cell*²³², el cual se encontraba acoplado a un microscopio confocal que permitía la determinación de la fluorescencia a lo largo del biofilm (**Figura 7 capítulo 2**). La fluorescencia de *GFPmut3* y E2-Crimson permitió ver por primera vez y de forma clara, una distribución espacial de las RNR de clase I y clase II en los biofilms de *P. aeruginosa*. En las capas más superficiales se observó el color verde asociado a la fluorescencia de la FP *GFPmut3*, mientras que en las capas más profundas del biofilm el color predominante era el rojo de E2-Crimson. Esta distribución es debida al gradiente de oxígenos que se forma durante la formación del biofilm bacteriano de *P. aeruginosa*²³³⁻²³⁵. Mientras que en las capas superficiales la concentración de oxígeno es máxima (21 %O₂), la perfusión del mismo disminuye a lo largo del biofilm debido a la matriz extracelular propia de un biofilm bacteriano^{166,168,235}. Además, el metabolismo celular de las bacterias consume el oxígeno embebido dentro de la matriz²³⁴ disminuyendo claramente su concentración. Ambos fenómenos generan que, en zonas intermedias (interfase) donde la concentración de oxígeno es suficiente como para que se produzca un cambio en el patrón génico de las la RNR^{71,81}, podamos observar una tonalidad naranja fruto de la combinatoria de la fluorescencia emitida por *GFPmut3* y E2-Crimson, asociados a los promotores de las RNR *PnrdA* (RNR de clase I) y *PnrdJ* (RNR de clase II) respectivamente. Por lo tanto, no sólo estamos visualizando un gradiente en la concentración de oxígeno dentro de un biofilm, sino

que también podemos observar un gradiente espacial, gracias al uso del sistema de vectores GLOW.

En general, ninguno de los experimentos realizados presentó problemas de ruido de fondo o *crosstalk* entre las proteínas fluorescentes de GFP $mut3$ y E2-Crismson. Por lo tanto, se pudo constatar que el sistema de monitorización génica mediante el uso del casete y sistema GLOW, codificado en nuestros vectores, es útil para determinar la expresión génica bajo condiciones dinámicas y puede ser utilizado en el estudio no sólo en los genes que codifican para las ribonucleotide reductasas, sino también de otros genes bacterianos en los que se tenga la intención de estudiar su expresión génica bajo condiciones ambientales dinámicas y diferenciadas.

Conclusiones

1. El factor transcripcional FleQ regula la expresión génica de *nrdR* en *P. aeruginosa* PAO1 durante el crecimiento planctónico, en condiciones formadoras de biofilm y en infecciones agudas en *G. mellonella*. Esta regulación ocurre mediante la unión de FleQ a su caja de unión específica (FleQ box) localizada a -258 pb en el promotor *PnrdR*, en relación con el codón ATG del gen.
2. El mecanismo de regulación de FleQ sobre *nrdR* se asemeja al “looping” de ADN tipo NtrC-like y no se ve afectado por las condiciones de oxígeno del medio de cultivo.
3. La delección del gen *fleQ* en una cepa de *P. aeruginosa* PAO1 provoca una alteración del fitness bacteriano, la incapacidad para formar un biofilm bacteriano y la modificación de la expresión génica asociada a estas condiciones.
4. La actividad reguladora de FleQ depende de las concentraciones de c-di-GMP y del estado fisiológico de la célula bacteriana. FleQ actúa como activador en condiciones planctónicas o de infección, y como represor en condiciones de formación de biofilm.
5. Se ha localizado una posible caja de unión a un regulador transcripcional no identificado que se comporta de la misma manera que FleQ tanto en crecimiento planctónico, en biofilm o durante la infección.
6. El factor transcripcional DnaA regula transcripcionalmente al gen *nrdR* en *E. coli*, sincronizando su expresión dependiente del ciclo celular.
7. El casete y sistema GLOW, utilizado en plásmidos o mediante inserciones cromosómicas, es una herramienta útil, versátil y rápida para la monitorización uno o varios genes bacterianos bajo condiciones ambientales dinámicas.
8. En los estudios que buscan evaluar la expresión génica de múltiples genes simultáneamente, es crucial considerar la compatibilidad entre las diferentes proteínas fluorescentes, para evitar el *crosstalk*, que podría alterar significativamente los resultados obtenidos.

9. Por primera vez, se ha estudiado simultáneamente la expresión de las distintas ribonucleótido reductasas en *P. aeruginosa* creciendo en biofilm, observándose un patrón de expresión diferenciado a lo largo del biofilm.

Bibliografía

1. Reichard, P., Baldesten, A. & Rutrehg, R. Formation of Deoxycytidine Phosphates from Cytidine Phosphates in Extracts from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **236**, 1150–1157 (1961).
2. Carlson, J., Fuchs, J. A. & Messing, J. Primary structure of the *Escherichia coli* ribonucleoside diphosphate reductase operon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**, 4294–4297 (1984).
3. Kolberg, M., Strand, K. R., Graff, P. & Kristoffer Andersson, K. Structure, function, and mechanism of ribonucleotide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1699**, 1–34 (2004).
4. Jordan, A. & Reichard, P. RIBONUCLEOTIDE REDUCTASES. *Annu Rev Biochem* **67**, 71–98 (1998).
5. Torrents, E., Aloy, P., Gibert, I. & Rodríguez-Trelles, F. Ribonucleotide reductases: Divergent evolution of an ancient enzyme. *J Mol Evol* **55**, 138–152 (2002).
6. Torrents, E. Ribonucleotide reductases: Essential enzymes for bacterial life. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, 89098 (2014).
7. Blakley, R. L. & Barker, H. A. Cobamide stimulation of the reduction of ribotides to deoxyribotides in *Lactobacillus leichmannii*. *Biochem Biophys Res Commun* **16**, 391–397 (1964).
8. Fontecave, M., Eliasson, R. & Reichard, P. Enzymatic Regulation of the Radical Content of the Small Subunit of *Escherichia coli* Ribonucleotide Reductase Involving Reduction of Its Redox Centers. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 9164–9170 (1989).
9. Tamarit, J., Mulliez, E., Meier, C., Trautwein, A. & Fontecave, M. The Anaerobic Ribonucleotide Reductase from *Escherichia coli*: THE SMALL PROTEIN IS AN ACTIVATING ENZYME CONTAINING A [4Fe-4S]²⁺ CENTER. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 31291–31296 (1999).
10. Greene, B. L. *et al.* Ribonucleotide Reductases: Structure, Chemistry, and Metabolism Suggest New Therapeutic Targets. *Annu Rev Biochem* **89**, 45–75 (2020).
11. Wheeler, L. J., Rajagopal, I. & Mathews, C. K. Stimulation of mutagenesis by proportional deoxyribonucleoside triphosphate accumulation in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)* **4**, 1450–1456 (2005).

12. Mathews, C. K. DNA precursor metabolism and genomic stability. *The FASEB Journal* **20**, 1300–1314 (2006).
13. Larsson, K. M. *et al.* Structural mechanism of allosteric substrate specificity regulation in a ribonucleotide reductase. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**, 1142–1149 (2004).
14. Brown, N. C. & Reichard, P. Role of effector binding in allosteric control of ribonucleoside diphosphate reductase. *J Mol Biol* **46**, 39–55 (1969).
15. Larsson, K. M., Andersson, J. & Sjöberg, B. M. Structural basis for allosteric substrate specificity regulation in anaerobic ribonucleotide reductases. *Structure* **9**, 739–750 (2001).
16. Reichard, P. From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* **260**, 1773–1777 (1993).
17. Lundin, D., Berggren, G., Logan, D. T. & Sjöberg, B. M. The Origin and Evolution of Ribonucleotide Reduction. *Life* **5**, 604 (2015).
18. Eriksson, M. *et al.* Binding of allosteric effectors to ribonucleotide reductase protein R1: reduction of active-site cysteines promotes substrate binding. *Structure* **5**, 1077–1092 (1997).
19. Örmö, M. & Sjöberg, B. M. An ultrafiltration assay for nucleotide binding to ribonucleotide reductase. *Anal Biochem* **189**, 138–141 (1990).
20. Rofougaran, R., Vodnala, M. & Hofer, A. Enzymatically Active Mammalian Ribonucleotide Reductase Exists Primarily as an $\alpha\beta_2$ Octamer. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 27705–27711 (2006).
21. Ingemarson, R. & Thelander, L. A kinetic study on the influence of nucleoside triphosphate effectors on subunit interaction in mouse ribonucleotide reductase. *Biochemistry* **35**, 8603–8609 (1996).
22. Torrents, E., Sahlin, M. & Sjöberg, B.-M. The Ribonucleotide Reductase Family : Genetics and Genomics. (2008).
23. Ruskoski, T. B. & Boal, A. K. The periodic table of ribonucleotide reductases. *J Biol Chem* **297**, (2021).
24. Stubbe, J. & Nocera, D. G. Radicals in Biology: Your Life is in Their Hands. *J Am Chem Soc* **143**, 13463 (2021).
25. King, M. The Medical Biochemistry page. 1996 - 2006. <https://themedicalbiochemistrypage.org/>.

26. Cotruvo, J. A. & Stubbe, J. Class I Ribonucleotide Reductases: Metallocofactor Assembly and Repair *in vitro* and *in vivo*. *Annu Rev Biochem* **80**, 733 (2011).
27. Levitz, T. S. & Drennan, C. L. Starting a new chapter on class Ia ribonucleotide reductases. *Curr Opin Struct Biol* **77**, 102489 (2022).
28. Nordlund, P. & Reichard, P. Ribonucleotide Reductases. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142443> **75**, 681–706 (2006).
29. Ando, N. *et al.* Structural interconversions modulate activity of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 21046–21051 (2011).
30. Minnihan, E. C., Nocera, D. G. & Stubbe, J. A. Reversible, long-range radical transfer in *E. coli* class Ia ribonucleotide reductase. *Acc Chem Res* **46**, 2524–2535 (2013).
31. Rose, H. R. *et al.* Structures of Class Id Ribonucleotide Reductase Catalytic Subunits Reveal a Minimal Architecture for Deoxynucleotide Biosynthesis. *Biochemistry* **58**, 1845–1860 (2019).
32. Rose, H. R. *et al.* Structural Basis for Superoxide Activation of *Flavobacterium johnsoniae* Class I Ribonucleotide Reductase and for Radical Initiation by its Dimanganese Cofactor. *Biochemistry* **57**, 2679 (2018).
33. Blaesi, E. J. *et al.* Metal-free class Ie ribonucleotide reductase from pathogens initiates catalysis with a tyrosine-derived dihydroxyphenylalanine radical. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 10022–10027 (2018).
34. Srinivas, V. *et al.* Metal-free ribonucleotide reduction powered by a DOPA radical in Mycoplasma pathogens. *Nature* **563**, 416 (2018).
35. Reichard, P., Baldesten, A. & Rutrehg, R. Formation of Deoxycytidine Phosphates from Cytidine Phosphates in Extracts from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **236**, 1150–1157 (1961).
36. Jordan, A. *et al.* A second class I ribonucleotide reductase in *Enterobacteriaceae*: characterization of the *Salmonella typhimurium* enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12892–12896 (1994).
37. Jordan, A., Aragall, E., Gibert, I. & Barbé, J. Promoter identification and expression analysis of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* *nrdEF* operons encoding one of two class I ribonucleotide reductases present in both bacteria. *Mol Microbiol* **19**, 777–790 (1996).

38. Cotruvo, J. A. & Stubbe, J. An active dimanganese(III)-tyrosyl radical cofactor in *Escherichia coli* class Ib ribonucleotide reductase. *Biochemistry* **49**, 1297 (2010).
39. Cotruvo, J. A., Stich, T. A., Britt, R. D. & Stubbe, J. Mechanism of assembly of the dimanganese-tyrosyl radical cofactor of class Ib ribonucleotide reductase: Enzymatic generation of superoxide is required for tyrosine oxidation via a Mn(III)Mn(IV) intermediate. *J Am Chem Soc* **135**, 4027–4039 (2013).
40. Stubbe, J. A. Di-iron-tyrosyl radical ribonucleotide reductases. *Curr Opin Chem Biol* **7**, 183–188 (2003).
41. Högbom, M. *et al.* The radical site in chlamydial ribonucleotide reductase defines a new R2 subclass. *Science* (1979) **305**, 245–248 (2004).
42. Jiang, W. *et al.* A manganese(IV)/iron(III) cofactor in *Chlamydia trachomatis* ribonucleotide reductase. *Science* (1979) **316**, 1188–1191 (2007).
43. Roshick, C., Iliffe-Lee, E. R. & McClarty, G. Cloning and characterization of ribonucleotide reductase from *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem* **275**, 38111–38119 (2000).
44. Stubbe, J. A. & Seyedsayamdost, M. R. Discovery of a New Class i Ribonucleotide Reductase with an Essential DOPA Radical and NO Metal as an Initiator of Long-Range Radical Transfer. *Biochemistry* **58**, 435–437 (2019).
45. Roca, I., Torrents, E., Sahlin, M., Gibert, I. & Sjöberg, B. M. NrdI essentiality for class Ib ribonucleotide reduction in *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **190**, 4849–4858 (2008).
46. Torrents, E. *et al.* *Euglena gracilis* Ribonucleotide Reductase. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 5604–5611 (2006).
47. Lundin, D., Gribaldo, S., Torrents, E., Sjöberg, B. M. & Poole, A. M. Ribonucleotide reduction - Horizontal transfer of a required function spans all three domains. *BMC Evol Biol* **10**, 1–19 (2010).
48. Torrents, E., Poplawski, A. & Sjöberg, B.-M. Two Proteins Mediate Class II Ribonucleotide Reductase Activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 16571–16578 (2005).
49. Eliasson, R., Pontis, E., Jordan, A. & Reichard, P. Allosteric Control of Three B12-dependent (Class II) Ribonucleotide Reductases. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 7182–7189 (1999).

50. Sintchak, M. D., Arjara, G., Kellogg, B. A., Stubbe, J. A. & Drennan, C. L. The crystal structure of class II ribonucleotide reductase reveals how an allosterically regulated monomer mimics a dimer. *Nat Struct Biol* **9**, 293–300 (2002).
51. Booker, S., Licht, S., Broderick, J. & Stubbe, J. A. Coenzyme B12-Dependent Ribonucleotide Reductase: Evidence for the Participation of Five Cysteine Residues in Ribonucleotide Reduction. *Biochemistry* **33**, 12676–12685 (1994).
52. Lawrence, C. C. *et al.* Binding of Cob(II)alamin to the Adenosylcobalamin-dependent Ribonucleotide Reductase from *Lactobacillus leichmannii*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 7039–7042 (1999).
53. Licht, S., Gerfen, G. J. & Stubbe, J. Thiyl Radicals in Ribonucleotide Reductases. *Science* (1979) **271**, 477–481 (1996).
54. Logan, D. T. Closing the circle on ribonucleotide reductases. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**, 251–253 (2011).
55. Reichard, P. The anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 8383–8386 (1993).
56. Reichard, P. Ribonucleotide Reductases: The Evolution of Allosteric Regulation. *Arch Biochem Biophys* **397**, 149–155 (2002).
57. Logan, D. T., Andersson, J., Sjöberg, B. M. & Nordlund, P. A Glycyl Radical Site in the Crystal Structure of a Class III Ribonucleotide Reductase. *Science* (1979) **283**, 1499–1504 (1999).
58. Torrents, E. *et al.* The Anaerobic (Class III) Ribonucleotide Reductase from *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 2463–2471 (2000).
59. Torrents, E., Eliasson, R., Wolpher, H., Gräslund, A. & Reichard, P. The Anaerobic Ribonucleotide Reductase from *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 33488–33494 (2001).
60. Andersson, J., Westman, M., Sahlin, M. & Sjöberg, B.-M. Cysteines Involved in Radical Generation and Catalysis of Class III Anaerobic Ribonucleotide Reductase. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 19449–19455 (2000).
61. Sun, X. *et al.* Generation of the glycyl radical of the anaerobic *Escherichia coli* ribonucleotide reductase requires a specific activating enzyme. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 2443–2446 (1995).

62. King, D. S. & Reichard, P. Mass spectrometric determination of the radical scission site in the anaerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **206**, 731–735 (1995).
63. Torrents, E., Eliasson, R., Wolpher, H., Gräslund, A. & Reichard, P. The Anaerobic Ribonucleotide Reductase from *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 33488–33494 (2001).
64. Mulliez, E., Ollagnier, S., Fontecave, M., Eliasson, R. & Reichardt, P. Formate is the hydrogen donor for the anaerobic ribonucleotide reductase from *Escherichia coli* (deoxyribonucleotide synthesis/glycyl radical/iron-sulfur center/evolution). *Biochemistry* **92**, 8759–8762 (1995).
65. Borovok, I. *et al.* *Streptomyces* spp. contain class Ia and class II ribonucleotide reductases: Expression analysis of the genes in vegetative growth. *Microbiology (N Y)* **148**, 391–404 (2002).
66. Masalha, M., Borovok, I., Schreiber, R., Aharonowitz, Y. & Cohen, G. Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *J Bacteriol* **183**, 7260–7272 (2001).
67. Cotruvo, J. A. & Stubbe, J. *Escherichia coli* class Ib ribonucleotide reductase contains a dimanganese(III)-tyrosyl radical cofactor *in vivo*. *Biochemistry* **50**, 1672 (2011).
68. Crona, M., Hofer, A., Astorga-Wells, J., Sjöberg, B.-M. & Tholander, F. Biochemical Characterization of the Split Class II Ribonucleotide Reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. (2015) doi:10.1371/journal.pone.0134293.
69. Sintchak, M. D., Arjara, G., Kellogg, B. A., Stubbe, J. A. & Drennan, C. L. The crystal structure of class II ribonucleotide reductase reveals how an allosterically regulated monomer mimics a dimer. *Nat Struct Biol* **9**, 293–300 (2002).
70. Grinberg, I. *et al.* The *Streptomyces* NrdR transcriptional regulator is a Zn ribbon/ATP cone protein that binds to the promoter regions of class Ia and class II ribonucleotide reductase operons. *J Bacteriol* **188**, 7635–7644 (2006).
71. Crespo, A., Pedraz, L., Astola, J. & Torrents, E. *Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Deficient Biofilm Formation in the Absence of Class II and III Ribonucleotide Reductases Due to Hindered Anaerobic Growth. (2016) doi:10.3389/fmicb.2016.00688.

72. Crespo, A., Gavalda, J., Julián, E. & Torrents, E. A single point mutation in class III ribonucleotide reductase promoter renders *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inefficient for anaerobic growth and infection OPEN. doi:10.1038/s41598-017-14051-2.
73. Borovok, I. *et al.* Alternative oxygen-dependent and oxygen-independent ribonucleotide reductases in *Streptomyces*: cross-regulation and physiological role in response to oxygen limitation. *Mol Microbiol* **54**, 1022–1035 (2004).
74. Prichard, M. N. & Shipman, C. Ribonucleotide Reductase: An Important Enzyme in the Replication of *Herpes Simplex Virus* Type 1 and a Target for Antiviral Chemotherapy. *Chemotherapy* **41**, 384–395 (1995).
75. Shiraki, K. *et al.* Viral ribonucleotide reductase attenuates the anti-herpes activity of acyclovir in contrast to amenamevir. *Antiviral Res* **180**, 104829 (2020).
76. Sakowski, E. G. *et al.* Ribonucleotide reductases reveal novel viral diversity and predict biological and ecological features of unknown marine viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 15786–15791 (2014).
77. Dwivedi, B., Xue, B., Lundin, D., Edwards, R. A. & Breitbart, M. A bioinformatic analysis of ribonucleotide reductase genes in phage genomes and metagenomes. *BMC Evol Biol* **13**, 33 (2013).
78. Harrison, A. O. & Moline, M. A. RIBONUCLEOTIDE REDUCTASE GENES INFLUENCE THE BIOLOGY AND ECOLOGY OF MARINE VIRUSES. (2019).
79. Garriga, X. *et al.* *nrdD* and *nrdG* Genes Are Essential for Strict Anaerobic Growth of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **229**, 189–192 (1996).
80. Martin, J. E. & Imlay, J. A. The alternative aerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*, NrdEF, is a manganese-dependent enzyme that enables cell replication during periods of iron starvation. *Mol Microbiol* **80**, 319–334 (2011).
81. Cendra, M. del M., Juárez, A. & Torrents, E. Biofilm Modifies Expression of Ribonucleotide Reductase Genes in *Escherichia coli*. *PLoS One* **7**, e46350 (2012).
82. Monje-Casas, F., Jurado, J., Prieto-Álamo, M.-J., Holmgren, A. & Pueyo, C. Expression Analysis of the *nrdHIEF* Operon from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 18031–18037 (2001).

83. Torrents, E. *et al.* NrdR controls differential expression of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase genes. *J Bacteriol* **189**, 5012–5021 (2007).
84. Boston, T. & Atlung, T. FNR-mediated oxygen-responsive regulation of the *nrdDG* operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**, 5310–5313 (2003).
85. Tolla, D. A. & Savageau, M. A. Regulation of Aerobic-to-Anaerobic Transitions by the FNR Cycle in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **397**, 893–905 (2010).
86. Jordan, A. *et al.* Ribonucleotide reduction in *Pseudomonas* species: Simultaneous presence of active enzymes from different classes. *J Bacteriol* **181**, 3974–3980 (1999).
87. Lundin, D., Torrents, E., Poole, A. M. & Sjöberg, B. M. RNRdb, a curated database of the universal enzyme family ribonucleotide reductase, reveals a high level of misannotation in sequences deposited to Genbank. *BMC Genomics* **10**, (2009).
88. Stover, C. K. *et al.* Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959–964 (2000).
89. Torrents, E., Westman, M., Sahlin, M. & Sjö, B.-M. Ribonucleotide Reductase Modularity ATYPICAL DUPLICATION OF THE ATP-CONE DOMAIN IN *Pseudomonas aeruginosa*. (2006) doi:10.1074/jbc.M601794200.
90. Johansson, R. *et al.* Structural Mechanism of Allosteric Activity Regulation in a Ribonucleotide Reductase with Double ATP Cones (Structure (2016) 24(6) (906–917)). *Structure* **24**, 1432–1434 (2016).
91. Herrick, J. & Sclavi, B. Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. *Mol Microbiol* **63**, 22–34 (2007).
92. Augustin, L. B., Jacobson, B. A. & Fuchs, J. A. *Escherichia coli* Fis and DnaA proteins bind specifically to the *nrd* promoter region and affect expression of an *nrd-lac* fusion. *J Bacteriol* **176**, 378–387 (1994).
93. Davies, B. W. *et al.* Hydroxyurea Induces Hydroxyl Radical-Mediated Cell Death in *Escherichia coli*. *Mol Cell* **36**, 845–860 (2009).
94. Han, J. S., Kwon, H. S., Yim, J.-B. & Hwang, D. S. Effect of IciA protein on the expression of the *nrd* gene encoding ribonucleoside diphosphate reductase in *E. coli*.

95. Zheng, D., Constantinidou, C., Hobman, J. L. & Minchin, S. D. Identification of the CRP regulon using *in vitro* and *in vivo* transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res* **32**, 5874 (2004).
96. Cendra, M. del M., Juárez, A., Madrid, C. & Torrents, E. H-NS is a novel transcriptional modulator of the ribonucleotide reductase genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **195**, 4255–4263 (2013).
97. Tuggle, C. K. & Fuchs, J. A. Regulation of the operon encoding ribonucleotide reductase in *Escherichia coli*: evidence for both positive and negative control. *EMBO J* **5**, 1077–1085 (1986).
98. Jacobson, B. A. & Fuchs, J. A. Multiple cis-acting sites positively regulate *Escherichia coli nrd* expression. *Mol Microbiol* **28**, 1315–1322 (1998).
99. Lee, Y. S., Kim, H. & Hwang, D. S. Transcriptional activation of the *dnaA* gene encoding the initiator for *oriC* replication by IciA protein, an inhibitor of *in vitro oriC* replication in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **19**, 389–396 (1996).
100. Rozman Grinberg, I. *et al.* A nucleotide-sensing oligomerization mechanism that controls NrdR-dependent transcription of ribonucleotide reductases. *Nature Communications* 2022 13:1 **13**, 1–10 (2022).
101. Rozman Grinberg, I. *et al.* A nucleotide-sensing oligomerization mechanism that controls NrdR-dependent transcription of ribonucleotide reductases. *Nature Communications* 2022 13:1 **13**, 1–10 (2022).
102. Crespo, A., Pedraz, L. & Torrents, E. Function of the *Pseudomonas aeruginosa* NrdR Transcription Factor: Global Transcriptomic Analysis and Its Role on Ribonucleotide Reductase Gene Expression. *PLoS One* **10**, e0123571 (2015).
103. Vassinova, N. & Kozyrev, D. A method for direct cloning of Fur-regulated genes: identification of seven new Fur-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology (N Y)* **146**, 3171–3182 (2000).
104. Leitão, J. H. & Sá-Correia, I. Growth-phase-dependent alginate synthesis, activity of biosynthetic enzymes and transcription of alginate genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Microbiol* **163**, 217–222 (1995).
105. Crespo, A., Pedraz, L., Van Der Hofstadt, M., Gomila, G. & Torrents, E. Regulation of ribonucleotide synthesis by the *Pseudomonas aeruginosa* two-component system AlgR in response to oxidative stress. doi:10.1038/s41598-017-17917-7.

106. Crespo, A., Pedraz, L., Van Der Hofstadt, M., Gomila, G. & Torrents, E. Regulation of ribonucleotide synthesis by the *Pseudomonas aeruginosa* two-component system AlgR in response to oxidative stress. *Scientific Reports* 2017 7:1 7, 1–15 (2017).
107. Sjöberg, B. M. & Torrents, E. Shift in ribonucleotide reductase gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* during infection. *Infect Immun* **79**, 2663–2669 (2011).
108. Borovok, I., Gorovitz, B., Schreiber, R., Aharonowitz, Y. & Cohen, G. Coenzyme B12 controls transcription of the *Streptomyces* class Ia ribonucleotide reductase *nrdABS* operon via a riboswitch mechanism. *J Bacteriol* **188**, 2512–2520 (2006).
109. Rodionov, D. A. & Gelfand, M. S. Identification of a bacterial regulatory system for ribonucleotide reductases by phylogenetic profiling. *Trends in Genetics* **21**, 385–389 (2005).
110. Borovok, I. *et al.* Alternative oxygen-dependent and oxygen-independent ribonucleotide reductases in *Streptomyces*: Cross-regulation and physiological role in response to oxygen limitation. *Mol Microbiol* **54**, 1022–1035 (2004).
111. Alkema, W. B. L., Lenhard, B. & Wasserman, W. W. Regulog analysis: detection of conserved regulatory networks across bacteria: application to *Staphylococcus aureus*. *Genome Res* **14**, 1362–1373 (2004).
112. Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A. & Koonin, E. V. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res* **28**, 33 (2000).
113. Grinberg, I. *et al.* Functional analysis of the *Streptomyces coelicolor* NrdR ATP-cone domain: Role in nucleotide binding, oligomerization, and DNA interactions. *J Bacteriol* **191**, 1169–1179 (2009).
114. Mckethan, B. L. & Spiro, S. Cooperative and allosterically controlled nucleotide binding regulates the DNA binding activity of NrdR. *Mol Microbiol* **90**, 278–289 (2013).
115. Naveen, V. & Hsiao, C. D. NrdR Transcription Regulation: Global Proteome Analysis and Its Role in *Escherichia coli* Viability and Virulence. *PLoS One* **11**, (2016).
116. Aravind, L. The ATP-cone: an evolutionarily mobile, ATP-binding regulatory domain. *J Mol Microbiol Biotechnol* (2000).

117. Grinberg, I. R. *et al.* A glutaredoxin domain fused to the radical-generating subunit of ribonucleotide reductase (RNR) functions as an efficient RNR reductant. *Journal of Biological Chemistry* **293**, 15889–15900 (2018).
118. Hasan, M., Banerjee, I., Rozman Grinberg, I., Sjöberg, B. M. & Logan, D. T. Solution Structure of the dATP-Inactivated Class I Ribonucleotide Reductase From *Leeuwenhoekiella blandensis* by SAXS and Cryo-Electron Microscopy. *Front Mol Biosci* **8**, 713608 (2021).
119. Rozman Grinberg, I. *et al.* Novel ATP-cone-driven allosteric regulation of ribonucleotide reductase via the radical-generating subunit. *Elife* **7**, (2018).
120. Brignole, E. J. *et al.* 3.3-Å resolution cryo-EM structure of human ribonucleotide reductase with substrate and allosteric regulators bound. *Elife* **7**, (2018).
121. Ando, N. *et al.* Allosteric Inhibition of Human Ribonucleotide Reductase by dATP Entails the Stabilization of a Hexamer. *Biochemistry* **55**, 373–381 (2016).
122. Ando, N. *et al.* Structural interconversions modulate activity of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 21046–21051 (2011).
123. Fairman, J. W. *et al.* Structural basis for allosteric regulation of human ribonucleotide reductase by nucleotide-induced oligomerization. *Nature Structural & Molecular Biology* **2011 18:3** **18**, 316–322 (2011).
124. Diggle, S. P. & Whiteley, M. Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology (United Kingdom)* **166**, 30–33 (2020).
125. Abram, K. Z., Jun, S. R. & Udaondo, Z. *Pseudomonas aeruginosa* Pangenome: Core and Accessory Genes of a Highly Resourceful Opportunistic Pathogen. *Adv Exp Med Biol* **1386**, 3–28 (2022).
126. Ojewumi, M. E. *et al.* Bioremediation: Data on *Pseudomonas aeruginosa* effects on the bioremediation of crude oil polluted soil. *Data Brief* **19**, 101–113 (2018).
127. Vélez, J. M. B., Martínez, J. G., Ospina, J. T. & Agudelo, S. O. Bioremediation potential of *Pseudomonas* genus isolates from residual water, capable of tolerating lead through mechanisms of exopolysaccharide production and biosorption. *Biotechnology Reports* **32**, e00685 (2021).

128. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>.
129. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>.
130. Bloom, D. E. & Cadarette, D. Infectious disease threats in the twenty-first century: Strengthening the global response. *Front Immunol* **10**, 445106 (2019).
131. Filiatrault, M. J., Picardo, K. F., Ngai, H., Passador, L. & Iglewski, B. H. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Genes Involved in Virulence and Anaerobic Growth. *Infect Immun* **74**, 4237 (2006).
132. Rehm, Bernd. *Pseudomonas*: model organism, pathogen, cell factory. 402 (2008).
133. Govan, J. R. W. & Deretic, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**, 539–574 (1996).
134. Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**, 194 (2002).
135. Murphy, T. F. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. <https://doi.org/10.1164/rccm.200709-1413OC> **177**, 853–860 (2012).
136. Reynolds, D. & Kollef, M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs* **2021 81:18** **81**, 2117–2131 (2021).
137. Sousa, A. M. & Pereira, M. O. *Pseudomonas aeruginosa* Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs-A Review. *Pathogens* **3**, 680–703 (2014).
138. Okkotsu, Y., Little, A. S. & Schurr, M. J. The *Pseudomonas aeruginosa* AlgZR two-component system coordinates multiple phenotypes. *Front Cell Infect Microbiol* **4**, (2014).
139. Lyczak, J. B., Cannon, C. L. & Pier, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**, 1051–1060 (2000).

140. ESTUDIO EPINE-EPPS 2015 Informe Global de España. (2015).
141. Pressler, T. *et al.* Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection definition: EuroCareCF Working Group report. *J Cyst Fibros* **10 Suppl 2**, (2011).
142. Folkesson, A. *et al.* Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nature Reviews Microbiology* **2012 10:12** **10**, 841–851 (2012).
143. Penesyan, A. *et al.* Genetically and Phenotypically Distinct *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolates Share a Core Proteomic Signature. *PLoS One* **10**, (2015).
144. Varga, J. J. *et al.* Genotypic and phenotypic analyses of a *Pseudomonas aeruginosa* chronic bronchiectasis isolate reveal differences from cystic fibrosis and laboratory strains. *BMC Genomics* **16**, (2015).
145. Conese, M. *et al.* Gene and cell therapy for cystic fibrosis: from bench to bedside. *J Cyst Fibros* **10 Suppl 2**, (2011).
146. Döring, G., Flume, P., Heijerman, H. & Elborn, J. S. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *J Cyst Fibros* **11**, 461–479 (2012).
147. Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* **22**, 582–610 (2009).
148. Solé, M. *et al.* *In vivo* evolution of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients admitted to an intensive care unit: mechanisms of resistance and antimicrobial exposure. *J Antimicrob Chemother* **70**, 3004–3013 (2015).
149. Qin, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2022 7:1** **7**, 1–27 (2022).
150. Mensa, J. *et al.* Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. *Revista Española de Quimioterapia* **31**, 78 (2018).
151. Pier, G. B. *et al.* Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections. *Science* **271**, 64–67 (1996).

152. Azam, M. W. & Khan, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today* **24**, 350–359 (2019).
153. Vallis, A. J., Yahr, T. L., Barbieri, J. T. & Frank, D. W. Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. *Infect Immun* **67**, 914–920 (1999).
154. Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V. & Foglino, M. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: Why so many? *Trends Microbiol* **8**, 498–504 (2000).
155. Gellatly, S. L. & Hancock, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* **67**, 159–173 (2013).
156. Irazoqui, J. E. *et al.* Distinct Pathogenesis and Host Responses during Infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *PLoS Pathog* **6**, e1000982 (2010).
157. Moradali, M. F., Ghods, S. & Rehm, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* **7**, 249785 (2017).
158. Lee, J. & Zhang, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* **6**, 26–41 (2015).
159. Stewart, P. S. & Franklin, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 2008 6:3 **6**, 199–210 (2008).
160. Costerton, J., Stewart, P. & Greenberg, E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (1979)* **284**, (1999).
161. Flemming, H. C. *et al.* The biofilm matrix: multitasking in a shared space. *Nature Reviews Microbiology* 2022 21:2 **21**, 70–86 (2022).
162. Tseng, B. S. *et al.* The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environ Microbiol* **15**, 2865–2878 (2013).
163. Pezzoni, M., Lemos, M., Pizarro, R. A. & Costa, C. S. UVA as environmental signal for alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*: role of this polysaccharide in the protection of planktonic cells and biofilms against lethal UVA doses. *Photochem Photobiol Sci* **21**, 1459–1472 (2022).
164. O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49–79 (2000).

165. Hogardt, M. *et al.* Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* **195**, 70–80 (2007).
166. Gordon, V., Bakhtiari, L. & Kovach, K. From molecules to multispecies ecosystems: the roles of structure in bacterial biofilms. *Phys Biol* **16**, (2019).
167. Stewart, P. S. & Costerton, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* **358**, 135–138 (2001).
168. Flemming, H. C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**, 623–633 (2010).
169. Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P. & Hall-Stoodley, L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology* 2017 15:12 **15**, 740–755 (2017).
170. Kaplan, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs* **34**, 737–751 (2011).
171. Guttenplan, S. B. & Kearns, D. B. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol Rev* **37**, 849–871 (2013).
172. Flemming, H. C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* 2016 14:9 **14**, 563–575 (2016).
173. Sakuragi, Y. & Kolter, R. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**, 5383–5386 (2007).
174. Lebeaux, D., Ghigo, J.-M. & Beloin, C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol Mol Biol Rev* **78**, 510 (2014).
175. Vandevenne, M., Delmarcelle, M. & Galleni, M. RNA regulatory networks as a control of stochasticity in biological systems. *Front Genet* **10**, 453416 (2019).
176. Remington, S. J. Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Sci* **20**, 1509 (2011).
177. Kremers, G. J., Gilbert, S. G., Cranfill, P. J., Davidson, M. W. & Piston, D. W. Fluorescent proteins at a glance. *J Cell Sci* **124**, 157–160 (2011).
178. Barbier, M. & Damron, F. H. Rainbow Vectors for Broad-Range Bacterial Fluorescence Labeling. *PLoS One* **11**, e0146827 (2016).

179. Miller, W. G., Leveau, J. H. J. & Lindow, S. E. Improved *gfp* and *inaZ* Broad-Host-Range Promoter-Probe Vectors. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.11.1243> **13**, 1243–1250 (2007).
180. Schneider, K. & Beck, C. F. Promoter-probe vectors for the analysis of divergently arranged promoters. *Gene* **42**, 37–48 (1986).
181. Jain, A. & Srivastava, P. Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol Lett* **348**, 87–96 (2013).
182. Reznikoff, W. S. Transposon Tn5. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091656> **42**, 269–286 (2008).
183. Green, B., Bouchier, C., Fairhead, C., Craig, N. L. & Cormack, B. P. Insertion site preference of Mu, Tn5, and Tn7 transposons. *Mob DNA* **3**, 1–6 (2012).
184. Raj, A. & van Oudenaarden, A. Nature, Nurture, or Chance: Stochastic Gene Expression and Its Consequences. *Cell* **135**, 216–226 (2008).
185. Lau, B. T. C., Malkus, P. & Paulsson, J. New quantitative methods for measuring plasmid loss rates reveal unexpected stability. *Plasmid* **70**, 353–361 (2013).
186. Algburi, A., Comito, N., Kashtanov, D., Dicks, L. M. T. & Chikindas, M. L. Control of biofilm formation: Antibiotics and beyond. *Appl Environ Microbiol* **83**, (2017).
187. Esani, S., Chen, T., Leung, K. P. & Laar, T. A. Van. Transcriptome Sequence of Antibiotic-Treated *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Resour Announc* **8**, (2019).
188. Silva-Rocha, R. & de Lorenzo, V. Chromosomal Integration of Transcriptional Fusions. *Methods in Molecular Biology* **1149**, 479–489 (2014).
189. Kalogeraki, V. S. & Winans, S. C. Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. *Gene* **188**, 69–75 (1997).
190. de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**, 386–405 (1994).
191. Choi, K. H. *et al.* A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nature Methods* 2005 2:6 **2**, 443–448 (2005).

192. Jia-Yun Tsai, C., Mei San Loh, J. & Proft, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. (2016) doi:10.1080/21505594.2015.1135289.
193. Jorjão, A. L. *et al.* From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for *in vivo* microbiological studies. (2018) doi:10.1080/21505594.2017.1397871.
194. Ménard, G., Rouillon, A., Cattoir, V. & Donnio, P. Y. *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Front Cell Infect Microbiol* **11**, (2021).
195. Olsen, R. J., Ebru Watkins, M., Cantu, C. C., Beres, S. B. & Musser, J. M. Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). *Virulence* **2**, 111 (2011).
196. Evans, B. A. & Rozen, D. E. A *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **31**, 2653–2660 (2012).
197. Benachour, A. *et al.* The Lysozyme-Induced Peptidoglycan N-Acetylglucosamine Deacetylase pgda (EF1843) Is Required for *Enterococcus faecalis* Virulence. *J Bacteriol* **194**, 6066–6073 (2012).
198. Chibebe Junior, J. *et al.* Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. *PLoS One* **8**, (2013).
199. Peleg, A. Y. *et al.* Reduced Susceptibility to Vancomycin Influences Pathogenicity in *Staphylococcus aureus* Infection. *J Infect Dis* **199**, 532 (2009).
200. Joyce, S. A. & Gahan, C. G. M. Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. *Microbiology (N Y)* **156**, 3456–3468 (2010).
201. Andrejko, M. & Mizerska-Dudka, M. Elastase B of *Pseudomonas aeruginosa* stimulates the humoral immune response in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol* **107**, 16–26 (2011).
202. Alghoribi, M. F., Gibreel, T. M., Dodgson, A. R., Beatson, S. A. & Upton, M. *Galleria mellonella* Infection Model Demonstrates High Lethality of ST69 and ST127 Uropathogenic *E. coli*. *PLoS One* **9**, 101547 (2014).
203. Insua, J. L. *et al.* Modeling *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis by Infection of the Wax Moth *Galleria mellonella*. *Infect Immun* **81**, 3552–3565 (2013).

204. Harding, C. R. *et al.* *Legionella pneumophila* pathogenesis in the *Galleria mellonella* infection model. *Infect Immun* **80**, 2780–2790 (2012).
205. Peleg, A. Y. *et al.* *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 2605–2609 (2009).
206. Seed, K. D. & Dennis, J. J. Development of *Galleria mellonella* as an alternative infection model for the *Burkholderia cepacia* complex. *Infect Immun* **76**, 1267–1275 (2008).
207. Olszak, T. *et al.* *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of environmental bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 6021–6033 (2015).
208. Kavanagh, K. & Fallon, J. P. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biol Rev* **24**, 79–83 (2010).
209. Jacobsen, I. D. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. *Virulence* **5**, 237 (2014).
210. Vertyporokh, L. & Wojda, I. Immune response of *Galleria mellonella* after injection with non-lethal and lethal dosages of *Candida albicans*. *J Invertebr Pathol* **170**, 107327 (2020).
211. Admella, J. & Torrents, E. Investigating bacterial infections in *Galleria mellonella* larvae: Insights into pathogen dissemination and behavior. *J Invertebr Pathol* **200**, 107975 (2023).
212. Cotter, G., Doyle, S. & Kavanagh, K. Development of an insect model for the *in vivo* pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**, 163–169 (2000).
213. Davies, B. W. *et al.* Hydroxyurea induces hydroxyl radical-mediated cell death in *Escherichia coli*. *Mol Cell* **36**, 845 (2009).
214. Allan, R. K., Mok, D., Ward, B. K. & Ratajczak, T. Modulation of chaperone function and cochaperone interaction by novobiocin in the C-terminal domain of Hsp90: evidence that coumarin antibiotics disrupt Hsp90 dimerization. *J Biol Chem* **281**, 7161–7171 (2006).
215. Erzberger, J. P., Pirruccello, M. M. & Berger, J. M. The structure of bacterial DnaA: implications for general mechanisms underlying DNA replication initiation. *EMBO J* **21**, 4763 (2002).

216. Trunk, K. *et al.* Anaerobic adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: definition of the Anr and Dnr regulons. *Environ Microbiol* **12**, 1719–1733 (2010).
217. Dasgupta, N., Ferrell, E. P., Kanack, K. J., West, S. E. H. & Ramphal, R. *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is $\sigma 70$ dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* **184**, 5240–5250 (2002).
218. Oladosu, V. I., Park, S. & Sauer, K. Flip the switch: the role of FleQ in modulating the transition between the free-living and sessile mode of growth in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* (2024) doi:10.1128/JB.00365-23.
219. Arora, S. K., Ritchings, B. W., Almira, E. C., Lory, S. & Ramphal, R. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J Bacteriol* **179**, 5574–5581 (1997).
220. Jyot, J., Dasgupta, N. & Ramphal, R. FleQ, the Major Flagellar Gene Regulator in *Pseudomonas aeruginosa*, Binds to Enhancer Sites Located Either Upstream or Atypically Downstream of the RpoN Binding Site. *J Bacteriol* **184**, 5251 (2002).
221. Lee, V. T. *et al.* A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol Microbiol* **65**, 1474–1484 (2007).
222. Bush, M. & Dixon, R. The Role of Bacterial Enhancer Binding Proteins as Specialized Activators of $\sigma 54$ -Dependent Transcription . *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **76**, 497–529 (2012).
223. Dasgupta, N., Arora, S. K. & Ramphal, R. *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 357–364 (2000).
224. Chanchal, Banerjee, P., Raghav, S., Goswami, H. N. & Jain, D. The antiactivator FleN uses an allosteric mechanism to regulate $\sigma 54$ -dependent expression of flagellar genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Adv* **7**, (2021).
225. Boyd, C. D. & O'Toole, G. A. Second Messenger Regulation of Biofilm Formation: Breakthroughs in Understanding c-di-GMP Effector Systems. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 439 (2012).
226. Cotter, P. A. & Stibitz, S. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr Opin Microbiol* **10**, 17–23 (2007).
227. Hickman, J. W. & Harwood, C. S. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* **69**, 376 (2008).

228. Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H. & Tasca Ribeiro, V. S. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens* 2022, Vol. 11, Page 300 **11**, 300 (2022).
229. Baraquet, C., Murakami, K., Parsek, M. R. & Harwood, C. S. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the *pel* operon promoter in response to c-di-GMP. *Nucleic Acids Res* **40**, 7207 (2012).
230. Wurtzel, O. *et al.* The single-nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body temperature. *PLoS Pathog* **8**, (2012).
231. Eckweiler, D., Dudek, C. A., Hartlich, J., Brötje, D. & Jahn, D. PRODORIC2: the bacterial gene regulation database in 2018. *Nucleic Acids Res* **46**, D320–D326 (2018).
232. Nielsen, M. W., Sternberg, C., Molin, S. & Regenberg, B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* biofilm in flow cells. *J Vis Exp* (2011) doi:10.3791/2383.
233. Werner, E. *et al.* Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6188–6196 (2004).
234. Jo, J., Price-Whelan, A. & Dietrich, L. E. P. Gradients and consequences of heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* **20**, 593 (2022).
235. Shree, P., Singh, C. K., Sodhi, K. K., Surya, J. N. & Singh, D. K. Biofilms: Understanding the structure and contribution towards bacterial resistance in antibiotics. *Medicine in Microecology* **16**, 100084 (2023).