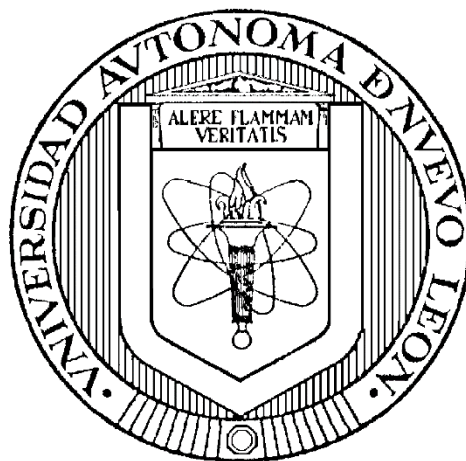


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA SlyA Y LA REGULACIÓN DE
METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Serratia marcescens***

Presentado Por

Q.B.P. VALERIA MEDRANO MEDELLÍN

**Como requisito parcial para la obtención del Grado de
Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Médica**

Julio 2026

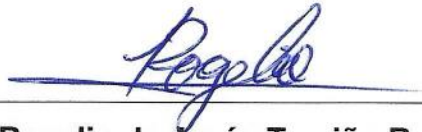
**CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA SlyA Y LA REGULACIÓN DE
METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Serratia marcescens***

Aprobación de la Tesis:



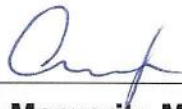
Dr. C. Ángel Andrade Torres

Director



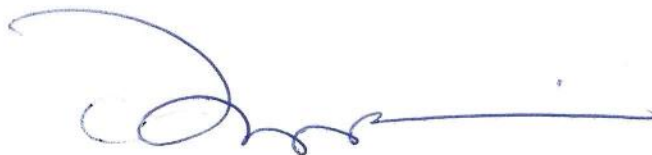
Dr. C. Rogelio de Jesús Treviño Rangel

Co-Director



Dr. C. Alexandra Margarita Montoya Mendoza

Miembro de la comisión



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

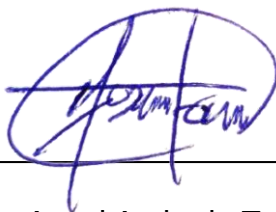
Subdirector de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA SlyA Y LA REGULACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE *Serratia marcescens*

Presentado por:

Q.B.P. Valeria Medrano Medellín

Este trabajo se realizó en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRECEI) adscrito al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Angel Andrade Torres. Y contó con financiamiento por parte de SECIHTI, Ciencia Básica y de Frontera [CBF20232024-1522]



Dr. Angel Andrade Torres

Director de Tesis

**CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA S1yA Y LA
REGULACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
DE *Serratia marcescens***

Q.B.P. VALERIA MEDRANO MEDELLÍN FUE BECARIO DE LA SECRETARIA
DE CIENCIA, HUMANIDADES, TECNOLOGIA E INNOVACIÓN (SECIHTI)
CON EL NÚMERO DE REGISTRO 2053243

ÍNDICE

SECCIÓN	PÁGINA
1. INTRODUCCIÓN	10
<i>Serratia marcescens</i>	10
Patogenia y virulencia de <i>Serratia marcescens</i>	12
Metabolitos secundarios de <i>Serratia marcescens</i>	14
Reguladores transcripcionales de la familia MarR	16
Subfamilia MarR/SlyA	18
SlyA de <i>Serratia marcescens</i>	19
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
Cepas bacterianas	24
Extracción de ADN genómico	25
Purificación de ADN plasmídico	26
Preparación de células electrocompetentes	27
Electroporación de células electrocompetentes	27
Clonación de <i>slyA</i>	28
Movilización de pBAD33slyA a <i>S. marcescens</i> HU2225	30

Evaluación de la estabilidad térmica de SlyA	31
Purificación de proteínas recombinantes	32
Diálisis y cuantificación de las proteínas purificadas	33
Amplificación de las regiones promotoras de <i>slyA</i> , <i>pigA</i> , <i>pigP</i> , <i>swrW</i> , y <i>eepR</i> ...	33
Ensayos de Desplazamiento de Movilidad Electroforética/ <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	34
6. RESULTADOS	35
Clonación de <i>slyA</i> en el vector pET28	35
Subclonación de <i>slyA</i> en el vector pBAD33.....	36
Transformación de pBAD33-slyA en <i>S. marcescens</i> HU2225	37
Análisis comparativo de la secuencia de SlyA de <i>S. marcescens</i> con proteínas homólogas de la subfamilia MarR/SlyA	38
Evaluación de la estabilidad de SlyA a diferentes temperaturas mediante inmunoreconocimiento.....	40
Purificación de proteínas recombinantes SlyA, CpxR, EepR y HexS	41
Amplificación de regiones promotoras	42
Evaluación de la interacción proteína–ADN de CpxR, HexS, EepR y SlyA con diferentes promotores	43
7. DISCUSIÓN	48
8. CONCLUSIONES	56

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	57
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. PCR de colonia para la evaluación del plásmido pET28-slyA.	35
Figura 2. Confirmación por PCR de plásmido pBAD33-slyA	37
Figura 3. Análisis de transformantes de <i>S. marcescens</i> HU2225 mediante PCR de colonia.	38
Figura 4. Alineamiento múltiple de proteínas de la subfamilia MarR/SlyA.....	39
Figura 5. Estabilidad de la proteína SlyA-His en <i>S. marcescens</i> HU2225 a distintas temperaturas.	40
Figura 6. Purificación de los reguladores transcripcionales SlyA, CpxR, EepR y HexS.....	41
Figura 7. Amplificación por PCR de las regiones promotoras <i>pigA</i> , <i>pigP</i> , <i>slyA</i> , <i>swrW</i> y <i>eepR</i>	43
Figura 8. Ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) de la proteína SlyA.....	44
Figura 9. Ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) de la proteína EepR	45
Figura 10. Ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) de la proteína CpxR.	46
Figura 11. Ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) de la proteína HexS	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio	24
Tabla 2. Cebadores utilizados en este estudio.....	28
Tabla 3. Matriz de similitud porcentual de proteínas homólogas de la subfamilia MarR/SlyA	39

1. INTRODUCCIÓN

Serratia marcescens

Serratia marcescens es un bacilo Gram negativo, móvil y anaerobio facultativo perteneciente al filo Pseudomonadota, clase Gammaproteobacteria y orden Enterobacterales. De acuerdo con las actualizaciones taxonómicas recientes, esta especie ha sido reclasificada dentro de la familia Yersiniaceae [7]. Fue descrita por primera vez en 1819 por el farmacéutico veneciano Bartolomeo Bizio al observar brotes de coloración rojiza sobre polentas y piezas de pan en Padua, Italia [44]. Bizio denominó a la bacteria *Serratia* en honor al físico Serafino Serrati y el epíteto *marcescens* del latín “marcescere” que significa “decadente”, “marchitarse” o “comenzar a podrirse” dado que observó que el pigmento rojo producido por la bacteria se degradaba rápidamente con el paso del tiempo [26,31].

El género *Serratia* comprende más de 26 especies distribuidas en diversos nichos ecológicos, incluyendo suelo, agua, plantas, insectos, pequeños mamíferos y seres humanos [34]. Aunque algunas especies pueden encontrarse asociadas transitoriamente al ser humano, no se consideran componentes habituales del microbioma intestinal [79]. Asimismo, se ha reportado que la transmisión de especies de *Serratia* asociadas a infecciones humanas puede ocurrir a través de dispositivos médicos contaminados, como catéteres, nebulizadores, ventiladores, soluciones intravenosas y lavabos hospitalarios. Entre las especies de *Serratia*, *S. marcescens* es la más frecuentemente implicada en brotes nosocomiales, consolidándose como un patógeno oportunista de relevancia clínica [31; 63].

En el contexto clínico, *S. marcescens* destaca por su capacidad para desarrollar resistencia intrínseca y adquirida a múltiples antibióticos, así como por su habilidad para formar biopelículas complejas que favorecen la colonización, persistencia y evasión de la respuesta inmune del huésped [73]. Adicionalmente, este microorganismo puede sintetizar diversos factores de virulencia, incluyendo enzimas extracelulares y sistemas de secreción especializados que facilitan la invasión y el daño a los tejidos del huésped [4]. Estas características afectan principalmente a pacientes inmunocomprometidos, neonatos y pacientes ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI), en quienes la bacteria puede ocasionar patologías graves como bacteriemia, neumonía, infecciones del tracto urinario y meningitis, las cuales se asocian con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad en entornos hospitalarios [56].

La notable capacidad adaptativa de *S. marcescens* se debe en parte a la elevada plasticidad de su genoma, la cual contribuye a la adquisición de material genético mediante transferencia horizontal y la incorporación de genes relacionados con resistencia, metabolismo, virulencia y mecanismos de regulación necesarios para sobrevivir en diversos entornos, tales como la rizosfera, las superficies hospitalarias o los tejidos del hospedero humano, donde la bacteria modula su expresión génica frente a presiones selectivas [1,73].

El estudio de la diversidad genómica y la capacidad adaptativa de *S. marcescens* resulta fundamental para comprender los mecanismos moleculares que regulan la expresión de factores de virulencia, la producción de metabolitos secundarios y la respuesta a señales ambientales. En este contexto, los reguladores

transcripcionales desempeñan un papel importante en la coordinación de estas respuestas adaptativas, favoreciendo la colonización, persistencia y establecimiento de infección por esta bacteria.

Patogenia y virulencia de *Serratia marcescens*

Los factores de virulencia de *S. marcescens* desempeñan un papel fundamental en el establecimiento de la infección, ya que favorecen la colonización de diferentes nichos, la evasión de la respuesta inmunitaria y la persistencia durante el proceso infeccioso. Entre ellos se encuentran las hemolisinas, fosfolipasas, proteasas, lipopolisacáridos, sideróforos, así como las estructuras involucradas en la adherencia y la motilidad, además de la capacidad para formar biopelículas [1, 55]. En conjunto, estos factores permiten a la bacteria adaptarse a distintos ambientes, obtener nutrientes y establecer una infección exitosa, favoreciendo su supervivencia y diseminación [4,7].

Entre los principales factores de virulencia destaca la hemolisina ShIA. La interacción de ShIA con las membranas celulares del hospedador induce la formación de poros [48,47], lo que deriva en procesos de vacuolización y apoptosis de las células eucariontes, favoreciendo la diseminación bacteriana [9]. La toxina ShIA ejerce su actividad citotóxica sobre células epiteliales, eritrocitos y células del sistema inmunitario, lo que contribuye al daño tisular y a la liberación de nutrientes que pueden ser aprovechados por la bacteria. La secreción de ShIA al medio extracelular y activación dependen de la proteína ShIB, la cual actúa como una

chaperona y canal que permite el transporte y la activación funcional de la hemolisina en el entorno extracelular [9,36]. La expresión del sistema *shlA-shlB* está vinculada con el sistema regulador RssAB, el cual coordina otros procesos como la formación de biopelículas y motilidad [55].

Adicional a la hemolisina, *S. marcescens* produce la fosfolipasa PhIA, la cual desestabiliza las membranas mediante la producción de lisofosfolípidos, desencadenando procesos hemolíticos y la muerte celular [62].

Otro grupo relevante de factores de virulencia de *S. marcescens* corresponde a diversas metaloproteasas dependientes de zinc. Estas enzimas también son secretadas por la bacteria y degradan componentes de matriz extracelular y proteínas del hospedador, como la elastina y el colágeno, favoreciendo la invasión tisular y la evasión de la respuesta inmune [62]. Entre las serralisinas más estudiadas se encuentran PrtS (también conocida como PrtA) y SlpB, capaces de degradar inmunoglobulinas, proteínas del complemento y otros componentes tisulares, contribuyendo a la invasión, la obtención de nutrientes y la persistencia bacteriana durante la infección [58,7].

Las fimbrias y los flagelos también desempeñan un papel importante en la patogenicidad de *S. marcescens*, ya que participan en la adherencia, la motilidad y la colonización del hospedador [5]. En respuesta a cambios en las condiciones ambientales, *S. marcescens* modifica la expresión de genes relacionados con estas estructuras, favoreciendo la transición entre los estados de motilidad tipo swimming y swarming [2,41]. Esta capacidad de adaptación facilita la colonización de superficies y la formación de biopelículas, procesos estrechamente asociados con

la persistencia de la bacteria y su capacidad para causar infecciones persistentes en entornos clínicos, donde la regulación de la motilidad y la arquitectura de la biopelícula son influenciadas por la disponibilidad de nutrientes y la señalización de señal de quorum [52,21].

Finalmente, la formación de biopelículas es uno de los factores de virulencia más importantes de *S. marcescens*. Las biopelículas están compuestas por exopolisacáridos, proteínas y ADN extracelular que protegen a la bacteria contra condiciones ambientales adversas, aumentan la tolerancia a los agentes antimicrobianos y promueven la persistencia bacteriana frente al sistema inmune del hospedero [55,57] Las biopelículas, además de actuar como una barrera física, también facilitan la comunicación intercelular mediante vías de señalización que coordinan funciones metabólicas y la expresión de genes de virulencia [52]. Durante su formación participan genes asociados al sistema de señal de quorum, el cual regula dinámicamente el desarrollo de la arquitectura de la comunidad bacteriana en respuesta a la disponibilidad de nutrientes [53].

Metabolitos secundarios de *Serratia marcescens*

S. marcescens sintetiza una amplia variedad de metabolitos secundarios que contribuyen a su adaptación ecológica, competencia microbiana y capacidad de colonización. Entre los más estudiados se encuentra la prodigiosina, un pigmento tripirrólico con actividad antitumoral, antibacteriana y antifúngica que le permite mediar interacciones complejas en diversos entornos biológicos [10,71]. Las

serratomolidas son biosurfactantes ciclodépsipeptídicos que permiten la motilidad tipo *swarming* y la colonización de diversas superficies [19]. Adicionalmente, las serrawettinas W1 y W2, se han asociado con actividades antimicrobianas de amplio espectro [10]. Algunas cepas de *S. marcescens* también pueden producir altiomicina, un péptido modificado que inhibe la síntesis de proteínas al bloquear la actividad de la peptidil transferasa en los ribosomas bacterianos [10].

La prodigiosina es un pigmento rojo tripirrólico responsable de la coloración característica de muchas cepas de *S. marcescens*. Este metabolito se sintetiza a partir de precursores derivados del 2-octenal y la prolina mediante una ruta biosintética controlada por un conjunto de 14 genes denominados *pigA-pigN*, organizados en un mismo clúster génico expresados como un solo operón [22]. Dicha ruta biosintética se divide en la síntesis independiente de un resto monopirrólico, realizada por los productos de los genes *pigB*, *pigD* y *pigE*, y una fracción bipirrólica regulada por el resto de los genes del operón [45], dando como resultado la formación de la molécula 4-metoxi-2,2'-bipirrol-5-carboxaldehído que posteriormente es condensada por la proteína PigC con el resto monopirrólico para completar la estructura del pigmento [14]. La producción de la prodigiosina ocurre principalmente durante la fase estacionaria de crecimiento, cuando la densidad celular alcanza niveles críticos que activan los mecanismos de regulación transcripcional del operón *pig* [18,22]. Asimismo, se ha observado que la prodigiosina contribuye a la hidrofobicidad de la superficie celular, favoreciendo la motilidad bacteriana y la dispersión aérea de la bacteria [39].

La síntesis de prodigiosina está influenciada por diversos factores ambientales, incluyendo la disponibilidad de nitrógeno, la temperatura, el pH, la aireación y el tiempo de incubación, además de mecanismos de detección de quórum y distintos reguladores transcripcionales que coordinan la expresión del clúster biosintético *pig* [51]. La complejidad de esta red regulatoria sugiere la participación coordinada de múltiples factores de transcripción, entre ellos SlyA un miembro de la familia de reguladores transcripcionales MarR, cuya actividad recientemente ha sido relacionada con la modulación de la producción de prodigiosina en *S. marcescens* [29].

Reguladores transcripcionales de la familia MarR

Los reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia MarR representan un conjunto de proteínas que actúan como sensores ambientales, permitiendo a las bacterias adaptarse a variaciones fisicoquímicas de su nicho ecológico mediante la modulación de la expresión génica [70]. Estas proteínas fueron descritas inicialmente en el operón *marRAB* en *Escherichia coli*, donde participan en la regulación de la resistencia a múltiples antibióticos [64], contribuyendo a la resistencia frente diversos compuestos como: detergentes, desinfectantes, conservantes [66] y compuestos fenólicos o lipofílicos aniónicos [70].

La amplia distribución de estas proteínas sugiere un origen evolutivo previo a la diversificación de bacterias y arqueas. Actualmente se han identificado 336 miembros putativos de la familia MarR en 45 especies de bacterias y 13 en especies

de arqueas. A nivel estructural se ha descrito que estos reguladores funcionan como homodímeros que reconocen sitios específicos en el ADN mediante un motivo estructural caracterizado por una hélice-giro-hélice alada (*winged helix-turn-helix*) [16]. De igual manera, actúan como represores transcripcionales al interactuar con regiones promotoras específicas e impedir el reclutamiento de la ARN polimerasa. Sin embargo, la interacción con moléculas como: compuestos fenólicos, especies reactivas de oxígeno, antibióticos o compuestos aromáticos pueden inducir cambios conformacionales que alteran su afinidad por el ADN y modificar la expresión génica [47,70].

Esta plasticidad regulatoria les permite a los miembros de esta familia modular la expresión de genes relacionados con resistencia a antibióticos, estrés oxidativo, solventes orgánicos y diversos factores patogénicos [32, 33]. En enterobacterias patógenas se ha reportado que estos reguladores también han sido relacionados con mecanismos de supervivencia intracelular, virulencia y metabolismo [46]. Algunos incluyen a EmrR (También conocido como MprA), regulador negativo del operón *emrAB* de *Escherichia coli* [67], RovA de *Yersinia pseudotuberculosis*, que modula la expresión de *invA*, una adhesina necesaria para la colonización durante la infección [63], y SlyA de *Salmonella* perteneciente a la subfamilia MarR/SlyA, cuyos miembros han sido asociados con la regulación de factores de virulencia y adaptación al estrés [17].

Subfamilia MarR/SlyA

SlyA es un regulador transcripcional perteneciente a la subfamilia MarR/SlyA, cuyos miembros desempeñan un papel importante en la regulación de procesos asociados con la virulencia, la adaptación al estrés y la supervivencia bacteriana en diversas enterobacterias. Fue descrita por primera vez en *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, donde se identificó su participación en la supervivencia intracelular dentro de macrófagos y en la regulación de diversos factores de virulencia [68]. Igualmente, se ha demostrado que contribuye a la resistencia frente al estrés oxidativo y a la acción de péptidos antimicrobianos [17].

Al igual que otros miembros de esta subfamilia, SlyA presenta una estructura de homodímero caracterizada por un dominio de unión al ADN con un motivo de hélice-giro-hélice alado, el cual facilita el reconocimiento de secuencias palindrómicas en los promotores de sus genes diana [23, 70]. modulando el reclutamiento de la ARN polimerasa mediante mecanismos de activación o represión transcripcional [70].

Uno de los mecanismos regulatorios más importantes asociados con SlyA es su capacidad para antagonizar la actividad represora de H-NS, una proteína nucleoidal, que actúa como represor global de genes adquiridos por transferencia horizontal, particularmente aquellos con bajo contenido GC [3,43]. Este mecanismo de contrasilenciamiento permite la expresión coordinada de islas de patogenicidad (SPI), facilitando la evolución adaptativa de las bacterias y la expresión de factores de virulencia [28].

Aunque la mayoría de los mecanismos regulatorios de SlyA han sido caracterizados en enterobacterias patógenas como *Salmonella enterica*, su función en *S. marcescens*, permanece menos estudiada. Esto sugiere la existencia de redes regulatorias aún no completamente descritas relacionadas con la adaptación bacteriana, la producción de metabolitos secundarios y la regulación de factores asociados con la virulencia.

SlyA de *Serratia marcescens*

Aunque SlyA ha sido ampliamente estudiado en enterobacterias como *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*, su función en *S. marcescens* permanece parcialmente caracterizada. En otras enterobacterias, este regulador ha sido asociado con la respuesta al estrés oxidativo, la resistencia a péptidos antimicrobianos, la tolerancia a sales biliares y la regulación de distintos procesos metabólicos, incluyendo el metabolismo del hierro y la biosíntesis de folatos [40,72]. La capacidad de SlyA para integrar señales ambientales depende de cambios conformacionales inducidos por la unión de diversos ligandos, los cuales modifican su afinidad por distintas regiones promotoras y, en consecuencia, alteran los patrones de expresión génica [72].

En *S. marcescens*, los mecanismos regulatorios mediados por SlyA aún no han sido completamente caracterizados. No obstante, diversos estudios han relacionado a SlyA con la producción del metabolito secundario prodigiosina. Específicamente, este regulador actúa de manera positiva sobre la transcripción del clúster de genes *pig*, donde las mutaciones de inserción provocan una disminución significativa en la

expresión de *pigA* y una reducción consecuente en la producción del pigmento [29]. Asimismo, se ha reportado que la generación de mutantes en *slyA* favorece la aparición de variantes no pigmentadas, sugiriendo una ventaja selectiva en el crecimiento asociada con la desactivación de esta ruta biosintética bajo determinadas condiciones ambientales [75]. Esta dinámica sugiere que la regulación de la prodigiosina por parte de SlyA no solamente interviene en la pigmentación bacteriana, sino que también podría representar un mecanismo de control en la asignación de recursos energéticos y en la adaptación fisiológica de la bacteria frente a restricciones ambientales [46]. Este mecanismo de regulación podría formar parte de una red regulatoria más amplia que involucra otros factores transcripcionales asociados con la virulencia, el metabolismo y la supervivencia bacteriana [13].

En este contexto, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo caracterizar la proteína SlyA de la cepa *S. marcescens* HU2225, evaluando su estabilidad térmica, así como su interacción con distintas regiones promotoras.

2. JUSTIFICACIÓN

Serratia marcescens es una bacteria ubicua, intrínsecamente resistente a diferentes clases de antibióticos. La producción de diversos factores de virulencia le permiten actuar como patógeno oportunista.

Reportes en varias bacterias patógenas indican que la proteína de la familia MarR, SlyA, tiene un papel clave en la expresión de genes relacionados con virulencia.

Debido a que se conoce muy poco acerca de la proteína homóloga a SlyA en *S. marcescens*, este proyecto se enfocará en el estudio de este regulador transcripcional y las posibles proteínas que controlan su expresión.

3. HIPÓTESIS

- a) La estabilidad del regulador transcripcional SlyA de *S. marcescens* se favorece a baja temperatura

- b) Las proteínas SlyA, CpxR, EepR y HexS participan en la regulación de la expresión de *slyA* de *S. marcescens*

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar a la proteína SlyA de *Serratia marcescens* y los elementos que regulan su expresión.

Objetivos Específicos

- Evaluar la estabilidad de SlyA de *S. marcescens* a diferentes temperaturas
- Analizar la interacción de diferentes reguladores transcripcionales con la región promotora de *slyA* de *S. marcescens*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Las bacterias se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) [10 g/L peptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl] a 30°C ó 37°C, con o sin agitación (200 RPM), según correspondiera. Cuando fue requerido, los cultivos de *E. coli* se suplementaron con kanamicina [50 µg/mL] o cloranfenicol [30 µg/mL]. Los cultivos para *S. marcescens* se suplementaron con cloranfenicol [120 µg/mL]. Todas las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo se conservaron en medio LB con 20% de glicerol a -70°C.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Cepa	Descripción	Origen o referencia
Cepas de <i>Escherichia coli</i>		
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80/ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Colección de laboratorio
BL21	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_e</i> (<i>r_e⁻</i> <i>m_e⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)	Colección de laboratorio
Cepa de <i>Serratia marcescens</i>		

HU2225

Aislado clínico de raspado (Sánchez-Pérez et al.,
corneal, Hospital Universitario 2025)
“Dr. José Eleuterio González”.

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico de la cepa *S. marcescens* HU2225 se realizó a partir de cultivos de toda la noche crecidos en medio LB. Las células se recuperaron mediante centrifugación a máxima velocidad durante 1 min. El sobrenadante fue cuidadosamente descartado, evitando la perturbación del pellet celular.

El pellet obtenido se resuspendió en 600 µL de buffer de lisis hasta obtener una suspensión homogénea. Posteriormente, se adicionaron 2 µL de proteinasa K, 2 µL de RNasa y 1 µL de lisozima, y la mezcla se incubó a 50 °C durante 1 h con el objetivo de favorecer la lisis celular y la degradación de proteínas y ARN contaminante.

Después de la incubación, se añadió un volumen igual de fenol/cloroformo, mezclando suavemente por inversión hasta la formación de una emulsión homogénea. La mezcla se centrifugó a máxima velocidad durante 5 min a temperatura ambiente, lo que permitió la separación de fases. La fase acuosa superior, correspondiente al ADN, fue cuidadosamente recuperada y transferida a un nuevo tubo.

Para la precipitación del ADN, se añadieron 3 volúmenes de etanol absoluto frío. mezclando suavemente por inversión. La muestra se incubó a -20°C durante 1 h. Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad durante 15 min a 4°C para la recuperación del ADN.

El sobrenadante fue descartado cuidadosamente y el ADN se lavó con 1 mL de etanol al 70%, seguido de una centrifugación a máxima velocidad durante 5 min. El sobrenadante fue nuevamente eliminado y el ADN se dejó secar a 55°C .

Finalmente, el ADN genómico se resuspendió en 100 μL de agua y se analizó mediante electroforesis.

Purificación de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó utilizando el Kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep (Jena Bioscience®), siguiendo las especificaciones del fabricante con las siguientes modificaciones. Las células se recolectaron mediante centrifugación a $13,300 \times g$ durante 2 minutos a 25°C . Una vez descartado el sobrenadante, la pelleta pastilla se resuspendió en 250 μL de Buffer de Lisis. A continuación, se añadieron 250 μL de Buffer de Neutralización y se mezcló por inversión manual vigorosa, seguido de una centrifugación a $10,000 \times g$ durante 10 minutos a 25°C .

El sobrenadante resultante se transfirió a una columna previamente activada y se centrifugó a $10,000 \times g$ por 1 minuto. Se procedió a realizar dos lavados consecutivos: el primero con 500 μL de Buffer de Lavado y el segundo con 700 μL del mismo buffer, centrifugando después de cada lavado a $10,000 \times g$ durante 2

minutos. Finalmente, la elución del ADN plasmídico se llevó a cabo añadiendo 50 μL de H_2O estéril precalentada a 52°C sobre la matriz de la columna, incubando durante 2 minutos y centrifugando a $10,000 \times g$ durante 1 minuto. El ADN plasmídico purificado obtenido se almacenó a -20°C para su uso posterior, y su calidad y concentración se verificaron mediante espectrofotometría (con relaciones A260/A280 y A260/A230) utilizando el equipo NanoDrop™ 2000/2000c y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Preparación de células electrocompetentes

Las cepas de *E. coli* TOP10, BL21 o *S. marcescens* HU2225 se cultivaron en caldo LB durante toda la noche. Posteriormente los cultivos se diluyeron en una proporción 1:100 en medio LB y se incubó a 30°C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.6-0.9 a 600 nm. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada se centrifugó a $7000 \times g$ a 4°C durante 20 minutos, la pastilla resultante se lavó con 30 mL de H_2O destilada estéril frío. Posteriormente, se adicionaron 20 mL de H_2O destilada estéril frío. Se repitió el proceso tres veces y la pastilla se resuspendió con 1 mL de glicerol al 20%; Las células se distribuyeron en alícuotas de 80 μL y se conservaron a -70°C hasta su posterior uso.

Electroporación de células electrocompetentes

Para la electroporación se añadieron 3 μL del plásmido de interés a las células electrocompetentes previamente preparadas. La mezcla se transfirió

inmediatamente a una celda de electroporación estéril de 1 mm de grosor, previamente enfriada. Se aplicó un pulso eléctrico de 1800 V utilizando un electroporador. Inmediatamente después del pulso, se añadieron 800 µL de medio LB estéril a la celda para facilitar la recuperación celular. La suspensión resultante se incubó a 37°C durante 1 hora. Finalmente, el cultivo se dividió para siembra en placas selectivas: en una placa de agar LB suplementado con el antibiótico correspondiente se sembraron 200 µL del cultivo, mientras que en una segunda placa se sembraron los 600 µL restantes, para maximizar la obtención de colonias transformadas.

Clonación de *slyA*

La amplificación del gen *slyA* se llevó a cabo a partir de DNA genómico de *S. marcescens* HU2225 mediante PCR utilizando cebadores específicos (Tabla 2), que incorporan sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *EcoRI*.

Tabla 2. Cebadores utilizados en este estudio

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Propósito
657	5' TTTTCATATGGAGTCAACATTAGGTTC 3'	Amplificación del <i>slyA</i>
658	5' TTTTGAATTCTTATTTGTTCTGCAGTTCG 3'	
Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Propósito
o		

195	5' GAGCAAGCGGACCTCATAAAG 3'	Control negativo r16S
196	5' TGCGGTTGGATTACCTCCT 3'	
292	5' CTGTCCAGCAGCGACAAC 3'	Amplificación del
293	5' CTGGCGTCAGCAGGTTATAC 3'	promotor <i>cpxR</i>
351	5' GCAGTCCRAGCATGTG 3'	Amplificación del
352	5' TTGTTATCCATTTGTTCTTCG 3'	promotor <i>eepR</i>
393	5' GCCAAAAGATAGATACTTCAC 3'	Amplificación del
		promotor <i>pigA</i>
708	5' TAAAATCCATGACGAACTCC 3'	Amplificación del
		promotor <i>pigA</i>
704	5' CTGTCGGCTTCCGTGTTTTG 3'	Amplificación del
705	5' TGCGTTGGTGGTTTTTCATTG 3'	promotor <i>pigP</i>
232	5' CAAGGCGAATGCCTGTAAC 3'	Amplificación de <i>recA</i>
233	5' GAGGATAGGCGCCACATAAA 3'	
709	5' AGAAAAGCCAGTCAATCGTG 3'	Amplificación de <i>swrW</i>
710	5' GAATAAGCGGACACGGAAC 3'	
662	5' TGAACCTAATGTTGACTCC 3'	Amplificación del
700	5' AGGACCAAATCGGGTAAGG 3'	promotor <i>slyA</i>
193	5'CCCCATATGACAACTGCAAATCGTC 3'	Amplificación del
194	5' TTTGGATCCGTTATTCTTCTTCGTCCAC 3'	promotor <i>hexS</i>

Se preparó una reacción con un volumen final de 50 µL, conteniendo los siguientes componentes: 1X de buffer de PCR, 0.3 mM de dNTPs, 1 µM de cada cebador, 1 U de Pfu DNA polimerasa y 100 ng de DNA genómico de *S. marcescens* HU2225, con las siguientes condiciones: 95°C durante 3 minutos, 30 ciclos de amplificación, 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 68°C durante 30 segundos.

El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas *NdeI* y *EcoRI* y se ligó al plásmido pET28a digerido con las mismas enzimas. La reacción de ligación se electroporó en células de *E. coli* TOP-10, dando lugar a la construcción pET28*slyA*. Para la subclonación de *slyA* en el plásmido pBAD33 la construcción pET28*slyA* se digirió con las enzimas de *XbaI* y *HindIII*. El fragmento correspondiente a *slyA* se purificó mediante la escisión de la banda correspondiente separada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. El producto resultante se ligó al plásmido pBAD33 digerido con las mismas enzimas. La reacción de ligación se electroporó en células de *E. coli* TOP-10, dando lugar a la construcción pBAD33*slyA*. El escrutinio de las colonias resultantes de las electroporaciones se realizó mediante PCR utilizando los oligos correspondientes (Tabla 2).

Movilización de pBAD33*slyA* a *S. marcescens* HU2225

La movilización del plásmido pBAD33*slyA* a *S. marcescens* HU2225 se realizó mediante electroporación seleccionando as colonias resultantes en agar LB con cloranfenicol [120 µg/mL]. El escrutinio de las colonias se realizó mediante PCR.

Evaluación de la estabilidad térmica de SlyA

A partir de un cultivo de toda la noche de *S. marcescens* HU2225 pBAD33-*slyA* se inocularon 40 mL de caldo LB (600 μ L del cultivo) y suplementado con arabinosa al 0.2% para inducir la expresión de *slyA*. El cultivo se incubó a 30°C con agitación constante de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.4-0.5 a 600 nm. Posteriormente, se recolectó una alícuota de 1.4 mL designada como tiempo 0 (T0). El cultivo restante se dividió en dos fracciones iguales de 20 mL cada una, las cuales se suplementaron con kanamicina [50 μ g/mL]. La primera fracción se mantuvo a 28°C mientras que la segunda se continuó incubando a 37°C en condiciones estáticas.

Se recolectaron 1.4 mL a intervalos específicos de 30, 60, 120 y 180 minutos. Cada muestra se centrifugó a $13,300 \times g$ por 2 minutos hasta obtener una pastilla que se almaceno a -20°C.

Las pastillas se resuspendieron en buffer 2X SDS ajustando el volumen a su crecimiento. Posteriormente las muestras se calentaron a 50°C por 5 minutos, y se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida, SDS-PAGE al 15% a 120 V durante 120 minutos.

Posterior a la separación, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (70 V durante 120 minutos). Las membranas se bloquearon con solución de caseína al 4% en PBS-Tween 0.1% durante 1 hora y 30 minutos a 4°C

en agitación constante. Para la detección de SlyA las membranas se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-His conjugado con HRP en una dilución 1:2,500, incubado durante 16 horas a 4°C con agitación suave. Finalmente, la señal se desarrolló utilizando sustrato quimioluminiscente.

Purificación de proteínas recombinantes

La expresión de las proteínas recombinantes SlyA, HexS, CpxR y EepR se llevó a cabo utilizando la cepa *E. coli* BL21(DE3) portadora de los plásmidos pET28slyA, pET28hexS, pET28cpxR o pET19eepR, respectivamente, a partir de cultivos de toda la noche se inocularon 150 mL de caldo LB con kanamicina [50 µg/mL] y se incubaron a 30°C con agitación constante de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 a 600 nm. Posteriormente se adiciono IPTG 0.1 mM, y se continuo la incubación a 30°C durante 4 horas. Las células se recolectaron por centrifugación a 7, 500 × g durante 15 minutos a 4°C.

La pastilla resultante se resuspendió en 16 mL de buffer de unión (10 mM de imidazol) adicionado con 1 mM de PMSF. Las células se lisaron mediante sonicación, la suspensión se centrifugó a 6, 000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifugo nuevamente a 12, 000 x g durante 1 hora a 4°C.

El sobrenadante se mezcló con resina Ni-NTA equilibrada en buffer de unión, la mezcla se incubó durante 1 hora a 4°C con agitación constante.

La mezcla se cargó en una columna de filtración, la resina se lavó con buffer de unión con concentraciones crecientes de imidazol a: 10 mM, 40 mM y 60 mM. La

elución de las proteínas se realizó añadiendo 800 μ L de buffer de elución 300 mM de imidazol (Tris 1.5 M pH 8.8, NaCl 4 M, Imidazol y agua destilada). Las muestras obtenidas se congelaron a -20°C hasta su uso.

Diálisis y cuantificación de las proteínas purificadas

Posterior a la purificación de las proteínas, éstas se sometieron a diálisis con buffer TENED (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA) en agitación constante y a 4 °C, realizando un cambio de buffer cada hora.

Al finalizar la diálisis las proteínas se cuantificaron utilizando Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit.

Amplificación de las regiones promotoras de *slyA*, *pigA*, *pigP*, *swrW*, y *eepR*.

Se amplificaron las regiones promotoras mediante PCR utilizando cebadores específicos para cada una los cuales se enlistan en la Tabla 2. Para la reacción de PCR se usó una reacción con un volumen final de 50 μ L que contenía 1X de buffer de High Fidelity, 0.3 mM de dNTPs, 1 μ M de cada, 0.8 U de High Fidelity DNA polimerasa y 100 ng de DNA genómico de *S. marcescens* HU2225 como templado.

Las temperaturas de alineamiento se optimizaron para cada par de cebadores según el promotor analizado, *recA* 59°C, *slyA* y *cpxR* 63°C, *swrW* 56°C, *pigP* y *eepR* 61°C, *r16S* y *pigA* 58°C.

Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. Los geles se visualizaron en un transiluminador UV para la detección de bandas de aproximadamente ~350 pb.

La concentración y pureza se determinó utilizando el equipo NanoDrop™ 2000/2000c. Los productos purificados se almacenaron a -20°C hasta su utilización en los ensayos de movilidad electroforética (EMSA).

Ensayos de Desplazamiento de Movilidad Electroforética/*Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)*

En un volumen de reacción final de 15 µL, conteniendo 100 ng del DNA, SlyA (0.2–1 µM), HexS (0.2-4µM), EepR (0.25-3µM) y CpxR (0.2-0.4µM) y buffer de unión (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, NaCl 100 mM, glicerol al 10%). Las reacciones se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y se separaron en geles de poliacrilamida nativos al 5% en las siguientes condiciones: 110 V durante 120 minutos a 4°C.

Al finalizar la electroforesis, los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 10 minutos con agitación suave y se visualizaron en un transiluminador UV.

6. RESULTADOS

Clonación de *slyA* en el vector pET28

Para evaluar el constructo del plásmido recombinante pET28-*slyA*, se realizó una PCR de colonias en transformantes de *E.coli* TOP10, como se describe en Material y Métodos. Los productos de la amplificación obtenidos fueron evaluados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las colonias transformadas con el plásmido recombinante presentaron una banda bien definida con un peso aproximado de 730 pb, correspondiente al tamaño esperado del gen *slyA* fusionado a la etiqueta His. En contraste, el control correspondiente al vector sin inserto no mostró dicha banda, observándose únicamente una señal de menor tamaño asociada al vector.

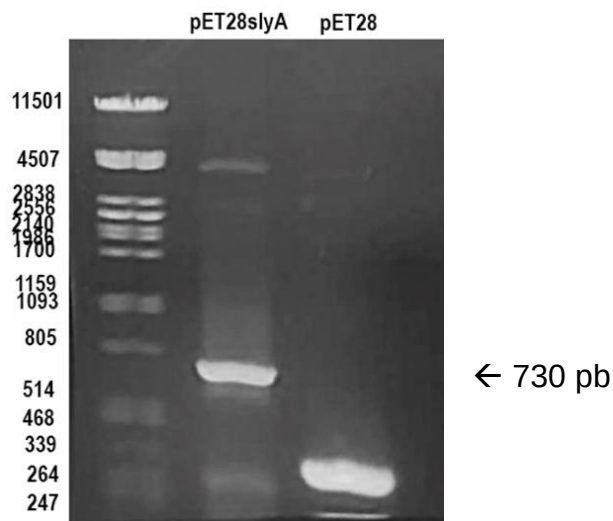


Figura 1. PCR de colonia para la evaluación del plásmido pET28slyA:

Escrutinio de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con pET28slyA, en una electroforesis en gel de agarosa al 1%. El carril izquierdo corresponde al marcador

de peso molecular λ /PstI. El fragmento correspondiente a *slyA*, se indica con una flecha.

Subclonación de *slyA* en el vector pBAD33

Con la finalidad de contar con un sistema alternativo de expresión para *slyA*, este gen fue subclonado desde pET28*slyA* hacia el vector pBAD33. Mediante un proceso de digestión enzimática en el vector receptor, seguida de la ligación del inserto y su posterior transformación en células competentes de *E. coli* TOP10. Posteriormente se hizo la verificación de la presencia del inserto en el nuevo vector, a través de una PCR de colonias transformadas y los productos de la amplificación fueron analizados y visualizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Como se observa en la figura 2, las colonias transformadas con el plásmido pBAD33*slyA* mostraron una banda de aproximadamente 730 pb, correspondiente al tamaño esperado de *slyA*, lo que nos indica una integración exitosa del inserto en el vector pBAD33.

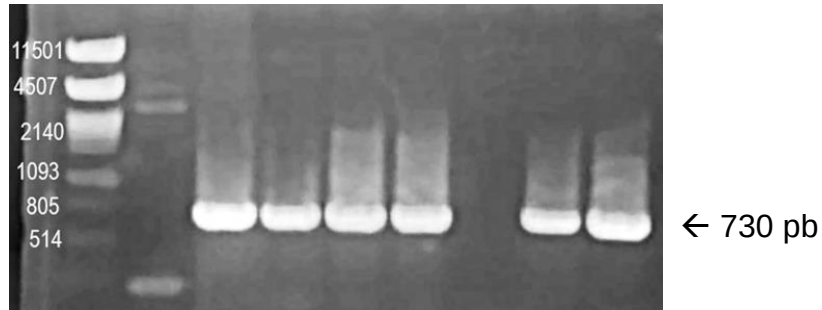


Figura 2. Confirmación por PCR de la construcción del plásmido pBAD33slyA:

Electroforesis en gel de agarosa al 1%. El fragmento correspondiente a *slyA*, se indica con una flecha. El carril izquierdo corresponde al marcador de peso molecular λ /*Pst*I.

Transformación de pBAD33slyA en *Serratia marcescens* HU2225

El plásmido pBAD33slyA se electroporó en la cepa *S. marcescens* HU2225. La confirmación de su incorporación se realizó mediante PCR de colonia (Figura 3), se observó la amplificación del fragmento correspondiente a *slyA* (aproximadamente 730 pb).

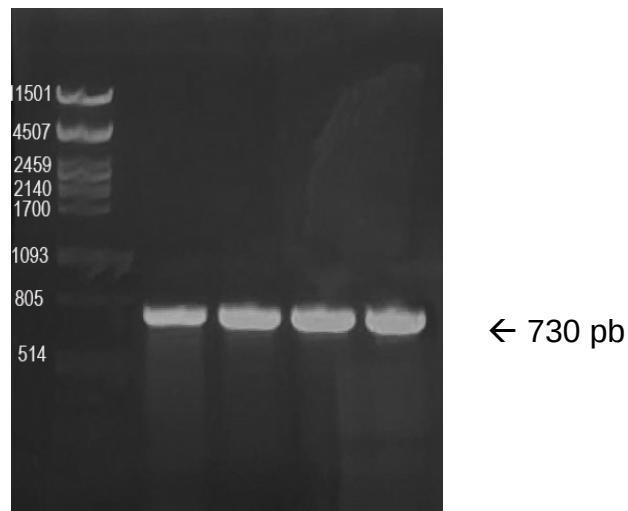


Figura 3. Análisis de transformantes de *S. marcescens* HU2225 mediante PCR de colonia: Las colonias obtenidas a partir de la transformación se evaluaron en un gel de agarosa al 1.5% posterior a la amplificación por PCR.

Análisis comparativo de la secuencia aminoacídica de SlyA de *S. marcescens* con proteínas homólogas de la subfamilia MarR/SlyA

Con el objetivo de evaluar el grado de conservación de la proteína SlyA de *S. marcescens* HU2225, se realizó un alineamiento múltiple de su secuencia aminoacídica con proteínas homólogas de la subfamilia MarR/SlyA, incluyendo SlyA de *Salmonella enterica*, RovA de *Y. enterocolitica*, MarR de *E. coli*, SlyA de *Klebsiella pneumoniae* y SlyA de *Enterobacter cloacae*. El alineamiento se llevó a cabo utilizando los programas Clustal Omega y UGENE y se visualizó en ESript (Figura 4). A partir del alineamiento, se generó una matriz de distancias basada en la similitud porcentual, con el fin de estimar el grado de conservación entre las secuencias analizadas.

```

1 E.coli_MarR      1 10 20 30 40 50
2 Serratia_SlyA   ..ME.....STLGSDLARLVVRWRALIDHRLKPLELTTQTHWVTLLHNINRLPPEQSQIQ
3 Yersinia_RovA   ..ME.....STLGSDLARLVVRWRALIDHRLKPLELTTQTHWVTLLHNINRLPPEQSQIQ
4 Salmonella_SlyA ..ME.....SPLLGSDLARLVRIWRALIDHRLKPLELTTQTHWVTLLHNINRLPPEQSQIQ
5 Klebsiella_SlyA MKLE.....SPLLGSDLARLVVRWRALIDHRLKPLELTTQTHWVTLLHNINRLPPEQSQIQ
6 Enterobacter_SlyA MKLE.....SPLLGSDLARLVVRWRALIDHRLKPLELTTQTHWVTLLHNINRLPPEQSQIQ
consensus>50      mkme.....spLGsdlarlvrvwraLi#hrLkPL#lTqthwvtLhnInqlppeqsq!#

1 E.coli_MarR      60 70 80 90 100 110
2 Serratia_SlyA    LAKAIGIEQPSLVRTLDLLEEKGLITRHTCANDRRAKRIKLTEAADPIIREVDSVITSTR
3 Yersinia_RovA    LAKAIGIEQPSLVRTLDLLEEKGLITRHTCANDRRAKRIKLTEQSSPIIEQVDGVICSTC
4 Salmonella_SlyA LAKAIGIEQPSLVRTLDLLEEKGLISRQTCASDRRAKRIKLTEKAEPLIAEMEEVIHKTR
5 Klebsiella_SlyA LAKAIGIEQPSLVRTLDLLEEKGLISRQTCASDRRAKRIKLTEKAEPLINEMEEVIKTR
6 Enterobacter_SlyA LAKAIGIEQPSLVRTLDLLEEKGLISRQTCASDRRAKRIKLTEKAAPIITEMEEAVITKTR
consensus>50      LaKaig!#qpsLvRtLDqLeeKGL!sRqtcanDrRakr!KLTEkaepie#veev!gktr

1 E.coli_MarR      120 130 140
2 Serratia_SlyA    HQEILTKNLTADEVATLEHLLKKVLP.....
3 Yersinia_RovA    .SEILSGITADEVHLLVGLIGKLEQNITELQNK..
4 Salmonella_SlyA .KEILGGISPDEEIELLSGLIDKLERNIIQLQSK..
5 Klebsiella_SlyA .GEILAGISSEEIELLIKLVAKLEHNIMELHSHD.
6 Enterobacter_SlyA .DEILSGVSKQEVETLLHLLIRKLEQNILDLQAKD.
consensus>50      .qEilsgisadEvelligLigkleqnimelqakd.

```

Figura 4. Alineamiento múltiple de secuencias de proteínas homólogas de la subfamilia MarR/SlyA: Los residuos conservados se muestran en rojo y las sustituciones conservadas en azul. Los puntos indican identidad con la secuencia de referencia o huecos introducidos durante el alineamiento. La secuencia consenso (>50 % de conservación) se presenta en la parte inferior.

Tabla 3. Matriz de similitud porcentual entre las secuencias aminoacídicas de reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia MarR.

	<i>E.coli_MarR</i>	<i>Serratia_SlyA</i>	<i>Yersinia_RovA</i>	<i>Salmonella_SlyA</i>	<i>Klebsiella_SlyA</i>	<i>Enterobacter_SlyA</i>
<i>E.coli_MarR</i>	100%	24%	24%	21%	25%	23%
<i>Serratia_SlyA</i>	24%	100%	86%	76%	80%	79%
<i>Yersinia_RovA</i>	24%	86%	100%	76%	77%	76%
<i>Salmonella_SlyA</i>	21%	76%	76%	100%	84%	83%
<i>Klebsiella_SlyA</i>	25%	78%	75%	83%	100%	88%
<i>Enterobacter_SlyA</i>	22%	77%	73%	81%	87%	100%

La matriz se obtuvo a partir del alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas utilizando Clustal Omega y UGENE. Los valores corresponden al porcentaje de similitud entre cada secuencia analizada.

Evaluación de la estabilidad de SlyA a diferentes temperaturas mediante Western blot

Se evaluó la estabilidad de la proteína SlyA en la cepa *S. marcescens* HU2225 transformada con pBAD33slyA, mediante un ensayo de inmunodetección por Western blot utilizando un anticuerpo anti-His. Los cultivos bacterianos fueron incubados a 28°C y 37°C, y se recolectaron muestras en distintos tiempos, de acuerdo con lo descrito en el apartado de Materiales y métodos.

Como se muestra en la Figura 5, se detectó una banda de aproximadamente 18 kDa que corresponde al tamaño esperado de la proteína SlyA-His en las muestras analizadas. En las condiciones de 28°C, la intensidad de la banda se mantuvo relativamente constante a lo largo de los tiempos evaluados. De manera similar, a 37°C se observó una intensidad de la señal semejante en los diferentes tiempos analizados. Lo que sugiere un comportamiento constante en la estabilidad de la proteína SlyA en función de la temperatura.

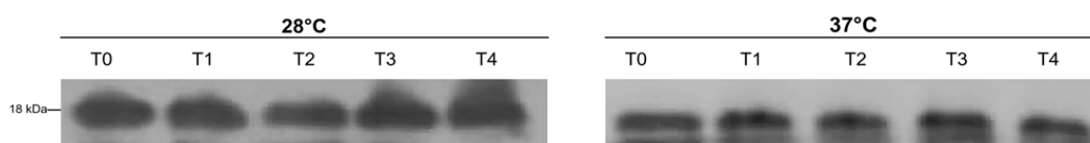


Figura 5. Estabilidad de la proteína SlyA-His en *S. marcescens* HU2225 a distintas temperaturas: Análisis por inmunodetección con anti-His. En ambas condiciones se observa la banda correspondiente a SlyA (17 kDa) constante a lo largo de todos los tiempos evaluados.

Purificación de proteínas recombinantes SlyA, CpxR, EepR y HexS

Con la finalidad de evaluar la interacción de *slyA* con diferentes reguladores transcripcionales, se llevó a cabo la purificación de las proteínas recombinantes SlyA, CpxR, EepR y HexS a partir de células de *E. coli* BL21, mediante cromatografía de afinidad utilizando una resina de Ni-NTA. Las eluciones obtenidas durante el proceso de purificación fueron analizadas mediante SDS-PAGE al 15% y teñidas con azul de Coomassie.

En el gel se observaron las bandas correspondientes a las proteínas SlyA (17 kDa), CpxR (28.9 kDa), EepR (33.5 kDa) y HexS (35 kDa), Figura 6.

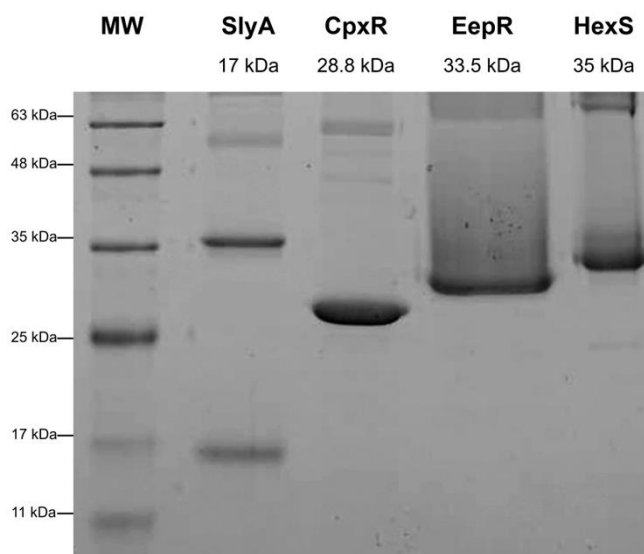


Figura 6. Purificación de los reguladores transcripcionales SlyA, CpxR, EepR y HexS: SDS-PAGE al 15% de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de afinidad. El gel fue teñido con azul de Coomassie. MW: Marcador de peso molecular (kDa). La proteína y su masa molecular se indican en la parte superior de cada carril.

Amplificación de regiones promotoras de *pigA*, *pigP*, *slyA*, *swrW*, y *eepR*

Con el objetivo de obtener las regiones promotoras de *pigA*, *pigP*, *slyA*, *swrW*, y *eepR* éstas se amplificaron mediante PCR, como se describe en la sección de Materiales y métodos. Como controles negativos se amplificaron regiones internas de *r16S* y *recA*.

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Como se muestra en la Figura 7, se observaron bandas de aproximadamente 300 pb para *slyA*, 350 pb correspondientes a los genes *swrW*, y *eepR*, 370 pb para *pigP* y *pigA* y para *r16S* una banda de aproximadamente 270 pb.

En contraste, no se obtuvo amplificación del gen *recA* en la cepa HU2225. Por ello, se empleó la cepa *S. marcescens* HU1848 como templado, en la cual se observó una banda de aproximadamente 250 pb.

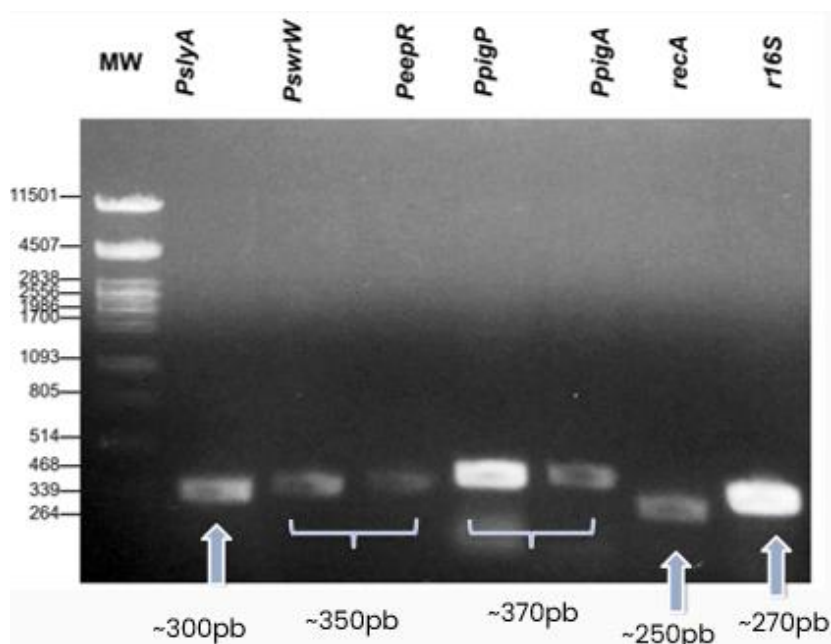


Figura 7. Amplificación por PCR de las regiones promotoras *pigA*, *pigP*, *slyA*, *swrW* y *eepR*. Los productos *r16S*, *pigA*, *pigP*, *slyA*, *swrW*, *eepR* y *recA* fueron separados en un gel de agarosa al 1.5%.

Evaluación de la interacción proteína–ADN de CpxR, HexS, EepR y SlyA con diferentes promotores mediante EMSA

Para evaluar la capacidad de unión de las proteínas reguladora SlyA, CpxR, EepR y HexS con diferentes regiones promotoras, se realizaron Ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA), utilizando los promotores de *slyA*, *eepR*, *swrW*, *pigP*, *pigA* y las regiones del gen *r16S* y *recA* como controles negativos.

Interacciones SlyA-ADN mediante EMSA

La interacción de la proteína SlyA fue evaluada con los promotores de *slyA*, *pigA*, *pigP*, *swrW*, *eepR* y la región *r16S* como control negativo.

Para los promotores de *slyA*, *pigA*, *pigP* y *eepR* se observaron patrones de desplazamiento caracterizados por una disminución de la banda de ADN libre expuesto a concentraciones crecientes de proteína (Figura 8). En contraste el promotor de *swrW* no mostró cambios en su patrón de migración, permaneciendo como ADN libre e indicando una ausencia de interacción detectable.

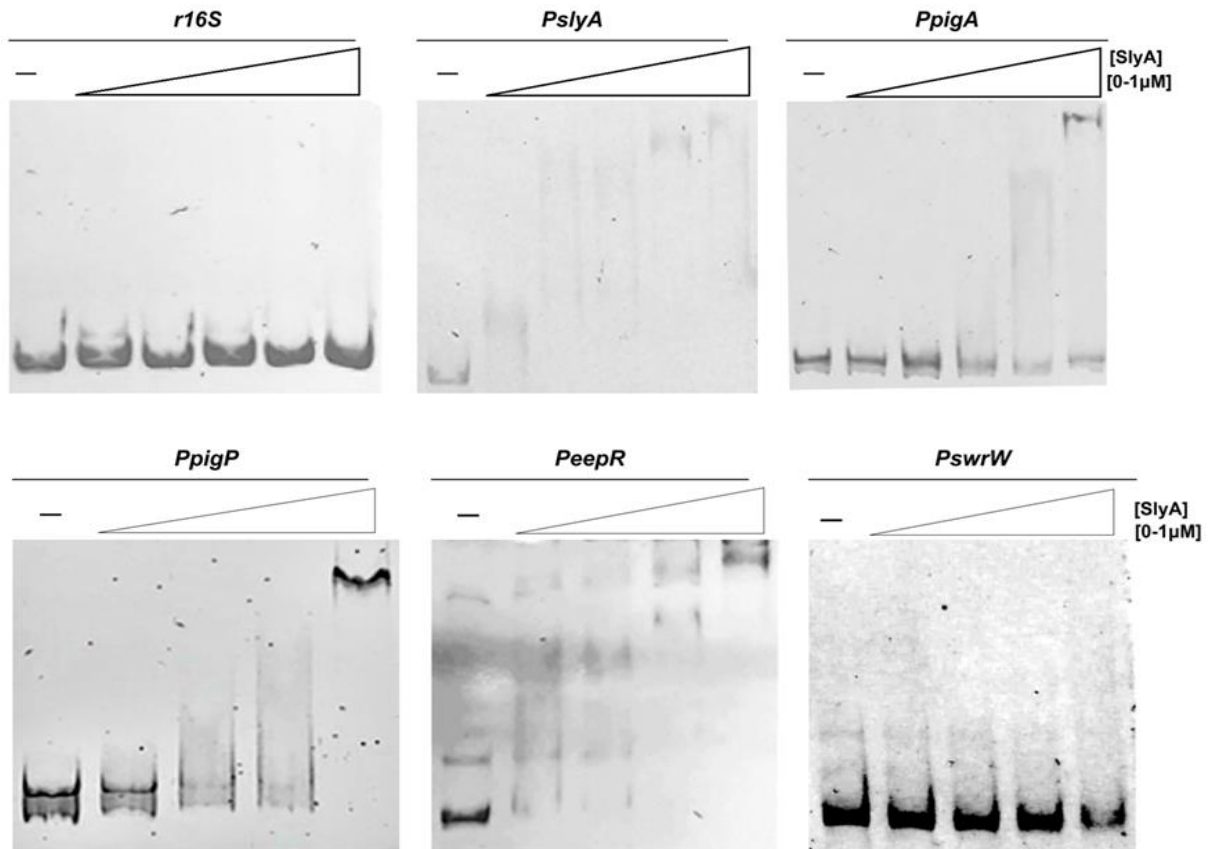


Figura 8. Ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) de la proteína SlyA. La región promotora correspondiente se indica en la parte superior de cada gel. El gen *r16S* se utilizó como control negativo.

Interacciones de EepR-DNA mediante EMSA

La evaluación de la proteína reguladora EepR fue evaluada igualmente mediante EMSA utilizando los fragmentos de ADN correspondientes a los promotores de *slyA* y *swrW*, así como la región *r16S* como control negativo. En este ensayo se observó que la interacción de EepR con el promotor de *slyA* mostró un desplazamiento dependiente de concentraciones crecientes de proteína, evidenciado por la

coexistencia de una banda de DNA libre y fracciones desplazadas, que indican la formación de complejos Proteína-DNA (Figura 9). El promotor de *swrW*, mostró un desplazamiento fuerte de movilidad electroforética, caracterizado por una disminución marcada de la banda de ADN libre y la formación de complejos Proteína-ADN, lo que sugiere una interacción específica.

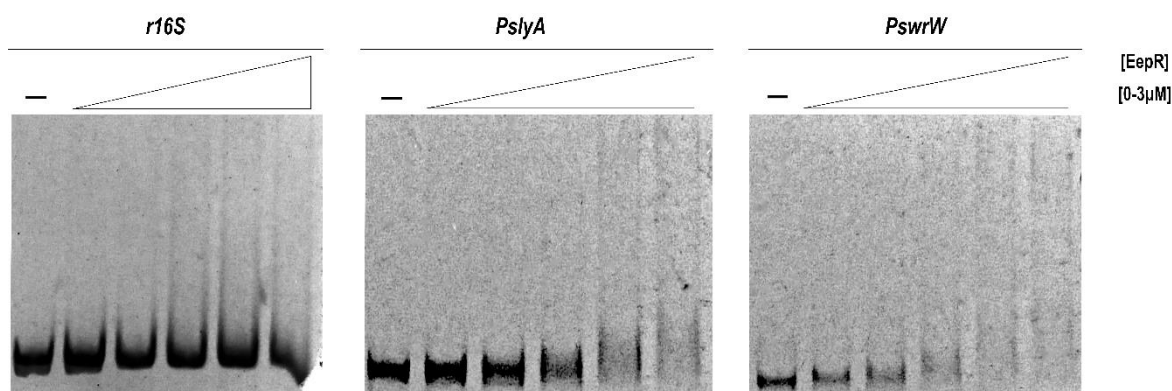


Figura 9. Ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) de la proteína EepR: con las regiones promotoras de *slyA* y *swrW*. La región de *r16S* se utilizó como control negativo.

Interacciones de CpxR-DNA mediante EMSA

La proteína reguladora CpxR fue evaluada mediante EMSA utilizando fragmentos de ADN correspondientes a los promotores de *slyA* y *eepR*, así como la región *r16S*.

Ambos promotores (*eepR* y *slyA*) mostraron desplazamientos dependientes de concentraciones crecientes de la proteína CpxR, caracterizados por una disminución progresiva de la banda de ADN libre. El fragmento correspondiente a

r16S no mostro cambios en su patrón de movilización, permaneciendo como ADN libre

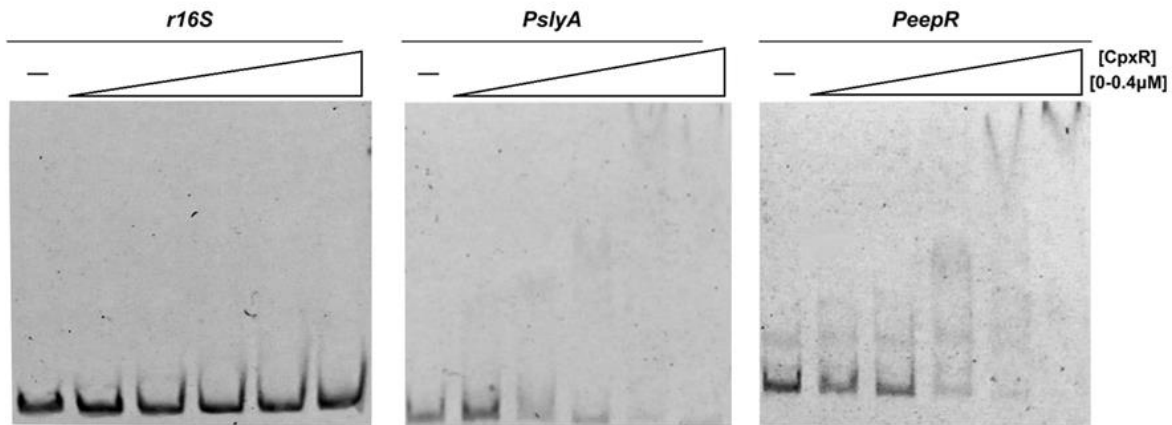


Figura 10. Ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) de la proteína CpxR; con las regiones promotoras de *slyA* y *eepR*. La región de *r16S* se utilizó como control negativo.

Interacciones de HexS-DNA mediante EMSA

HexS fue evaluada utilizando fragmentos de ADN correspondientes con los promotores *slyA* y *eepR*, así como la región *r16S*.

En el caso del promotor de *eepR*, se observó un desplazamiento dependiente de concentraciones crecientes de HexS, con presencia de bandas de ADN libre y fracciones desplazadas, evidenciando la formación de complejos Proteína-ADN.

En contraste, el promotor de *slyA* no mostró cambios en su patrón de migración en presencia de HexS, manteniéndose como ADN libre, lo que indica la ausencia de interacción entre la proteína y este promotor.

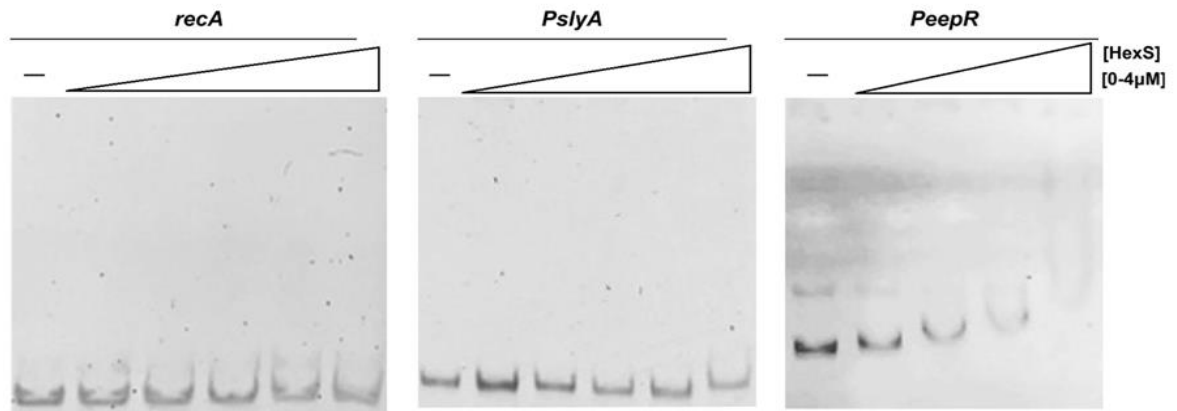


Figura 11. Ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) de la proteína HexS: con las regiones promotoras de *slyA* y *eepR* La región de *recA* se utilizó como control negativo.

7. DISCUSIÓN

Los reguladores transcripcionales pertenecientes a la subfamilia MarR/SlyA participan en la regulación de diversos procesos fisiológicos, incluyendo la respuesta al estrés ambiental, la adaptación metabólica y la modulación de factores de virulencia en múltiples bacterias patógenas [35,70]. Aunque la función de SlyA ha sido ampliamente estudiada en microorganismos como *Salmonella enterica*, donde desempeña un papel importante en la resistencia al estrés oxidativo y la supervivencia intracelular en macrófagos [8,23], la caracterización funcional de este regulador y sus homólogos en otras enterobacterias continúa siendo limitada. En particular, los mecanismos regulatorios mediados por SlyA en *S. marcescens* permanecen parcialmente comprendidos. En este contexto, el presente estudio permitió caracterizar la proteína SlyA de la cepa *S. marcescens* HU2225, evaluando su estabilidad proteica a 28 °C y 37 °C, así como su capacidad de interacción con distintas regiones promotoras, aportando evidencia experimental que contribuye a comprender su posible función regulatoria en esta bacteria.

La construcción de los sistemas recombinantes pET28slyA y pBAD33slyA, así como la posterior transformación de este último en la cepa *S. marcescens* HU2225, constituyeron una etapa fundamental para la caracterización funcional del regulador transcripcional SlyA. La generación de estos plásmidos permitió disponer de las herramientas necesarias para la obtención y purificación de la proteína recombinante en cantidades suficientes para la realización de ensayos *in vitro*, orientados a evaluar su estabilidad térmica y su capacidad de interacción con

distintas regiones promotoras. Asimismo, la implementación de estos sistemas de expresión constituye una estrategia ampliamente utilizada para la caracterización funcional de proteínas regulatorias bacterianas [63].

Por otra parte, se realizó un análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas de la proteína SlyA de *S. marcescens* HU2225 y homólogos funcionales de esta proteína en otras Enterobacterias. Entre ellas la proteína RovA de *Y. enterocolitica* con la cual mostró un alto grado de similitud en la conservación de residuos asociados con el dominio de unión al ADN tipo hélice-giro-hélice alada, seguida de SlyA de *K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *Salmonella enterica*. Esta similitud en sus estructuras es una característica distintiva entre los miembros de esta de esta subfamilia y esencial para el reconocimiento de secuencias promotoras específicas [74]. En contraste, MarR de *E. coli* presentó una menor similitud, lo que refleja la divergencia existente entre los miembros de la familia MarR y la subfamilia MarR/SlyA [70].

A partir del elevado grado de conservación observado entre SlyA de *S. marcescens* HU2225 y RovA de *Y. enterocolitica*, se evaluó el efecto de la temperatura sobre el comportamiento de la proteína a 28 °C y 37 °C. Se ha reportado que RovA de *Y. enterocolitica* es un regulador termo modulable cuya actividad disminuye significativamente a 37 °C debido a la inducción de cambios conformacionales en un bucle termosensible localizado dentro de su dominio de dimerización y en residuos presentes en la hélice C-terminal. Estas modificaciones favorecen el despliegue parcial de la proteína, disminuyen su capacidad de unión al ADN e incrementan su susceptibilidad a la proteólisis [24, 50].

SlyA de *Salmonella* enterica comparte una elevada similitud con RovA de *Yersinia*. Sin embargo, a diferencia de RovA, SlyA de *Salmonella* no presenta propiedades de termosensor y mantiene su estabilidad estructural y actividad reguladora a 37°C [50]. Esta diferencia funcional entre ambas proteínas se atribuye a variaciones específicas en la secuencia aminoacídica. En la cual se demostró que mediante una mutagénesis dirigida se introdujeron tres sustituciones correspondientes a SlyA de *Salmonella* en RovA de *Yersinia* (G116A, S127I y G128K), confiriéndole una mayor estabilidad conformacional frente a los cambios de temperatura [50,71] y eliminando sus propiedades de termosensado [20] y estabilizando el núcleo hidrofóbico de la proteína, que previene el desplegamiento térmico característico de RovA [25]. En conjunto, estos resultados apuntan que, dentro de la subfamilia MarR/SlyA, la conservación del plegamiento tridimensional no implica necesariamente la conservación de mecanismos especializados de respuesta a señales ambientales, como el termosensado.

Con base en las diferencias funcionales previamente descritas entre los homólogos de la subfamilia MarR/SlyA, en el presente estudio se evaluó si SlyA de *S. marcescens* HU2225 presentaba un comportamiento similar al de RovA, considerando el alto grado de conservación estructural entre ambas proteínas. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron que, tras la incubación de la proteína a 28°C y 37°C SlyA permaneció detectable por Western blot a ambas temperaturas. Este comportamiento es consistente con una mayor estabilidad en comparación con el comportamiento termosensible de RovA, sugiriendo que las propiedades funcionales de SlyA de *S. marcescens* HU2225 podrían asemejarse más a las de

SlyA de *Salmonella enterica*. Respaldando la idea de que, aunque los miembros de la subfamilia MarR/SlyA comparten una estructura similar y el dominio hélice-giro-hélice responsable del reconocimiento del ADN [74], las variaciones puntuales en sus secuencias de aminoácidos pueden modificar sus propiedades funcionales, incluyendo su sensibilidad a distintos estímulos ambientales [70].

Con el fin de determinar si las propiedades estructurales y funcionales observadas para SlyA de *S. marcescens* HU2225 se reflejaban en su actividad como regulador transcripcional, se analizó mediante ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) su interacción con distintas regiones promotoras, así como la de otros reguladores transcripcionales con la región promotora de *slyA*. En primer lugar, se evaluó la capacidad de SlyA de interactuar con su propio promotor con la finalidad de determinar un posible mecanismo de autorregulación. Los ensayos de EMSA demostraron que efectivamente SlyA es capaz de reconocer y unirse a su región promotora, lo cual sugiere la presencia de elementos de reconocimiento en dicha secuencia y la posibilidad de un mecanismo de autorregulación transcripcional. Este comportamiento ha sido descrito para diversos miembros de la familia MarR, en los cuales la unión a sus propios promotores o genes blanco constituye un mecanismo de autorregulación transcripcional que permite a estos reguladores controlar sus propios niveles de expresión intracelular [70] y modular la transcripción de genes blanco asociados a la resistencia antimicrobiana y virulencia, desempeñando además un papel importante en la modulación de genes adquiridos horizontalmente [71,72]. Bajo esta premisa, la interacción observada entre SlyA y

su promotor sugiere que este regulador podría formar parte de un circuito de autorregulación que contribuya al control de su expresión en *S. marcescens*.

De manera similar, SlyA fue capaz de unirse a las regiones promotoras de *pigA* y *pigP*, asociados con la biosíntesis y regulación de la producción de prodigiosina en *S. marcescens* [46]. Esta interacción sugiere que SlyA podría participar de manera directa en la regulación transcripcional de la red genética involucrada en la producción de este metabolito secundario. Estos resultados son consistentes con estudios previos que han propuesto a SlyA como un regulador positivo de la biosíntesis de prodigiosina, ya que mutantes de *slyA* presentan una disminución significativa en la producción del pigmento, dando lugar a fenotipos incoloros, junto con alteraciones en la tasa de crecimiento y la virulencia en cepas como SCQ1 de *Serratia* [75].

Además de la interacción observada de SlyA con las regiones promotoras de *pigA* y *pigP*, se detectó su capacidad de unirse a las regiones promotoras de *eepR* y *hexS*, reguladores implicados en la modulación de redes transcripcionales asociadas con la producción de prodigiosina y otros metabolitos secundarios en *S. marcescens* [27,46]. Estas interacciones sugieren que SlyA podría participar en múltiples niveles de la jerarquía regulatoria de la biosíntesis de prodigiosina, extendiéndose más allá de los elementos del clúster *pig* hacia reguladores que coordinan la expresión de esta red en respuesta a señales fisiológicas y ambientales.

Asimismo, se analizó la capacidad de SlyA para interactuar con la región promotora de *swrW* involucrada en la biosíntesis de la serrawettina W1 y asociado con la

motilidad tipo *swarming* y la colonización de superficies [37]. Sin embargo, bajo las condiciones evaluadas en este estudio no se observó la formación del complejo proteína-ADN, sugiriendo que SlyA no reconoce la secuencia de este promotor en dichas condiciones experimentales. No obstante, no puede descartarse que esta interacción dependa de factores adicionales o de condiciones fisiológicas específicas que modulen la actividad de SlyA, como se ha descrito en otros sistemas de la familia MarR/SlyA, donde su función puede verse influenciada por la presencia de reguladores nucleoidales como H-NS [74,77]. En este aspecto, la regulación de *swrW* ha sido asociada con redes regulatorias complejas que incluyen a PigP, el cual participa en el control de la expresión de este locus mediante mecanismos dependientes de múltiples componentes regulatorios [59] .

Dado que se observó la interacción de SlyA con distintas regiones promotoras, también se analizó la capacidad de los reguladores transcripcionales EepR, CpxR y HexS para interactuar con la región promotora de *slyA*. Mediante ensayos de EMSA realizados bajo condiciones experimentales similares, se observó la formación de complejos proteína-ADN en la interacción de los reguladores EepR y CpxR con dicha región promotora.

EepR es un regulador transcripcional vinculado frecuentemente con el control de la virulencia, cuya afinidad por secuencias específicas ha sido evaluada previamente en distintos contextos genómicos [15]. La formación del complejo proteína-ADN observada en los ensayos de EMSA indica que EepR es capaz de unirse a la región promotora de *slyA*, lo que sugiere una interacción directa con esta región promotora. Este comportamiento es consistente con modelos descritos en *Salmonella*, donde

reguladores globales como H-NS y PhoP participan en redes complejas de control génico [38]. Por otra parte, CpxR es un regulador de respuesta perteneciente al sistema de dos componentes CpxA/R el cual se activa frente a diversos estresores de la envoltura celular (como el pH alcalino, detergentes, EDTA y alteraciones en la composición de la membrana). CpxR modula la expresión de genes involucrados en la respuesta al estrés y reprime la biosíntesis de metabolitos secundarios, entre ellos la prodigiosina, mediante la regulación del operón *pig* [15,30]. Debido a esto, la interacción observada de CpxR con el promotor de *slyA* indica que este regulador es capaz de reconocer secuencias regulatorias dentro de esta región promotora. Este comportamiento se ha reportado en otros microorganismos como *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium*, donde SlyA ha sido implicado en mecanismos de contrasupresión asociados a la regulación mediada por H-NS en respuesta a condiciones ambientales específicas [6]. Asimismo, se ha descrito que miembros de la familia MarR/SlyA pueden interactuar funcionalmente con sistemas de silenciamiento global como H-NS; sin embargo, la posible competencia directa por sitios de unión requiere evidencia adicional mediante ensayos de competencia o *DNase I footprinting*.

A diferencia de los resultados anteriores, para el regulador de HexS no se detectó la formación del complejo proteína-ADN entre HexS y la región promotora de *slyA* bajo las condiciones experimentales evaluadas. Considerando que HexS ha sido descrito como un regulador global involucrado en la represión de la biosíntesis de prodigiosina y de diversos factores de virulencia en *S. marcescens* [58], la ausencia de unión observada sugiere que su influencia sobre *slyA*, en caso de existir,

probablemente ocurra de manera indirecta a través de otros componentes de la red regulatoria. No obstante, serán necesarios estudios funcionales adicionales para determinar si HexS participa de forma indirecta en la regulación de este gen y establecer el impacto biológico de dicha interacción.

En resumen, los resultados obtenidos permiten proponer que SlyA constituye un componente importante dentro de la red regulatoria que controla la biosíntesis de prodigiosina en *S. marcescens* HU2225. La interacción de este regulador con múltiples regiones promotoras, incluyendo genes biosintéticos, reguladores transcripcionales y su propio promotor, sugiere que SlyA podría participar en la integración de diversas señales fisiológicas y ambientales que coordinan la producción de metabolitos secundarios y otros procesos asociados con la adaptación y la virulencia bacteriana. Asimismo, la identificación de CpxR y EepR como proteínas capaces de reconocer la región promotora de *slyA*, aunado a la ausencia de interacción con HexS, evidencia que la regulación de este gen forma parte de una red jerárquica con distintos niveles de control, en la que no todos los reguladores participan mediante interacciones directas.

Aunque los ensayos de EMSA permitieron demostrar la capacidad de unión de estos reguladores, es necesario complementar estos resultados mediante estudios de expresión génica, mutagénesis dirigida y/o ensayos funcionales que permitan establecer el efecto regulatorio específico de cada interacción.

8. CONCLUSIONES

1. El regulador transcripcional SlyA de *S. marcescens* HU2225 a diferencia de su homólogo más cercano RovA de *Yersinia*, mostró estabilidad a temperaturas de 28°C y 37°C, indicando que no presenta termo modulación
2. Los análisis de los Ensayos de Desplazamiento de Movilidad Electroforética (EMSA) demostraron que SlyA interactúa con su propia región promotora, sugiriendo un mecanismo de autorregulación
3. SlyA mostró la capacidad de interactuar con las regiones promotoras de *pigA*, *pigP* y *eepR*, lo que respalda su participación en rutas asociadas con la producción de prodigiosina en *S. marcescens*
4. Se observó que los reguladores transcripcionales CpxR y EepR interactúan con la región promotora de *slyA*, sugiriendo la formación de redes regulatorias complejas

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abreo, Eduardo, y Nora Altier. «Pangenome of *Serratia marcescens* strains from nosocomial and environmental origins reveals different populations and the links between them». *Scientific Reports* 9, n.º 1 (2019): 46. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37118-0>.
2. Alberti, L., y R. M. Harshey. «Differentiation of *Serratia Marcescens* 274 into Swimmer and Swarmer Cells». *Journal of Bacteriology* 172, n.º 8 (1990): 4322-28. <https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4322-4328.1990>.
3. Ali, Sabrina S., Jeremy Soo, Chitong Rao, et al. «Silencing by H-NS Potentiated the Evolution of *Salmonella*». *PLOS Pathogens* 10, n.º 11 (2014): e1004500. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004500>.
4. Araújo, Isaac Moura, Leandro Marques Correia, Diógenes De Queiroz Dias, et al. «*Serratia marcescens*: Uma Revisão Detalhada Sobre Características, Patogenicidade e Perspectivas Terapêuticas». En *Ciências Biológicas: fundamentos da vida e biodiversidade* 4, 1.ª ed. Atena Editora, 2025. <https://doi.org/10.22533/at.ed.246142513105>.
5. Bando, Hironori, Kiyoshi Okado, Wamdaogo M. Guelbeogo, et al. «Intra-Specific Diversity of *Serratia Marcescens* in Anopheles Mosquito Midgut Defines Plasmodium Transmission Capacity». *Scientific Reports* 3, n.º 1 (2013): 1641. <https://doi.org/10.1038/srep01641>.
6. Bartoli, Julia, Julie Pamela Viala, y Emmanuelle Bouveret. «SlyA Transcriptional Regulator Is Not Directly Affected by ppGpp Levels».

Frontiers in Microbiology Volume 11-2020 (2020).

<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.01856>.

7. Boldeanu, Lidia, Mihail Virgil Boldeanu, Marius Bogdan Novac, Mohamed-Zakaria Assani, y Lucrețiu Radu. «*Serratia Marcescens*: A Versatile Opportunistic Pathogen with Emerging Clinical and Biotechnological Significance». *International Journal of Molecular Sciences* 26, n.º 23 (2025): 11479. <https://doi.org/10.3390/ijms262311479>.
8. Buchmeier, N., S. Bossie, C. Y. Chen, F. C. Fang, D. G. Guiney, y S. J. Libby. «SlyA, a Transcriptional Regulator of *Salmonella* Typhimurium, Is Required for Resistance to Oxidative Stress and Is Expressed in the Intracellular Environment of Macrophages». *Infection and Immunity* 65, n.º 9 (1997): 3725-30. <https://doi.org/10.1128/iai.65.9.3725-3730.1997>.
9. Chen, Shicheng, Jochen Blom, y Edward D. Walker. «Genomic, Physiologic, and Symbiotic Characterization of *Serratia marcescens* Strains Isolated from the Mosquito *Anopheles stephensi*». *Frontiers in Microbiology* Volume 8-2017 (2017). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01483>.
10. Clements, Tanya, Marina Rautenbach, Thando Ndlovu, Sehaam Khan, y Wesaal Khan. «A Metabolomics and Molecular Networking Approach to Elucidate the Structures of Secondary Metabolites Produced by *Serratia marcescens* Strains». *Frontiers in Chemistry* Volume 9-2021 (2021). <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.633870>.

11. Clements-Decker, Tanya, Marina Rautenbach, Wilma van Rensburg, Sehaam Khan, Marietjie Stander, y Wesaal Khan. «Secondary metabolic profiling of *Serratia marcescens* NP10 reveals new stephensioides and glucosamine derivatives with bacterial membrane activity». *Scientific Reports* 13, n.º 1 (2023): 2360. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28502-6>.
12. Colgan, Aoife M., Carsten Kröger, Médéric Diard, et al. «The Impact of 18 Ancestral and Horizontally-Acquired Regulatory Proteins upon the Transcriptome and sRNA Landscape of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium». *PLOS Genetics* 12, n.º 8 (2016): e1006258. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006258>.
13. Dalebroux, Zachary D., Sarah L. Svensson, Erin C. Gaynor, y Michele S. Swanson. «ppGpp Conjures Bacterial Virulence». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74, n.º 2 (2010): 171-99. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-09>.
14. Darshan, N., y H. K. Manonmani. «Prodigiosin and Its Potential Applications». *Journal of Food Science and Technology* 52, n.º 9 (2015): 5393-407. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1740-4>.
15. De Anda-Mora, Karla L., Faviola Tavares-Carreón, Carlos Alvarez, et al. «Increased Proteolytic Activity of *Serratia Marcescens* Clinical Isolate HU1848 Is Associated with Higher *eepR* Expression». *Polish Journal of Microbiology* 73, n.º 1 (2024): 11-20. <https://doi.org/10.33073/pjm-2024-002>.

16. Deochand, Dinesh K., y Anne Grove. «MarR family transcription factors: dynamic variations on a common scaffold». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 52, n.º 6 (2017): 595-613.
<https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1344612>.
17. Dolan, Kyle T., Erica M. Duguid, y Chuan He. «Crystal Structures of SlyA Protein, a Master Virulence Regulator of *Salmonella*, in Free and DNA-bound States*». *Journal of Biological Chemistry* 286, n.º 25 (2011): 22178-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.245258>.
18. Domröse, Andreas, Andreas S. Klein, Jennifer Hage-Hülsmann, et al. «Efficient recombinant production of prodigiosin in *Pseudomonas putida*». *Frontiers in Microbiology* Volume 6-2015 (2015).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00972>.
19. Eckelmann, Dennis, Michael Spiteller, y Souvik Kusari. «Spatial-Temporal Profiling of Prodiginines and Serratamolides Produced by Endophytic *Serratia Marcescens* Harbored in *Maytenus Serrata*». *Scientific Reports* 8, n.º 1 (2018): 5283. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23538-5>.
20. Erhardt, Marc, y Petra Dersch. «Regulatory principles governing *Salmonella* and *Yersinia* virulence». *Frontiers in Microbiology* Volume 6-2015 (2015).
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2015.00949>.

21. Guttenplan, Sarah B., y Daniel B. Kearns. «Regulation of flagellar motility during biofilm formation». *FEMS Microbiology Reviews* 37, n.º 6 (2013): 849-71. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12018>.
22. Hage-Hülsmann, Jennifer, Alexander Grünberger, Stephan Thies, et al. «Natural biocide cocktails: Combinatorial antibiotic effects of prodigiosin and biosurfactants». *PLOS ONE* 13, n.º 7 (2018): 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200940>.
23. Haider, Fouzia, y James K. lithgow. «DNA Recognition by the *Salmonella Enterica* Serovar *Typhimurium* Transcription Factor SlyA». *International Microbiology* (ES), n.º 11 (2008): 245-50. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.68>.
24. Herbst, Katharina, Matthias Bujara, Ann Kathrin Heroven, et al. «Intrinsic Thermal Sensing Controls Proteolysis of *Yersinia* Virulence Regulator RovA». *PLOS Pathogens* 5, n.º 5 (2009): e1000435. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000435>.
25. Heroven, Ann Kathrin, Geraldine Nagel, Hien J. Tran, Susanne Parr, y Petra Dersch. «RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and rovA expression in *Yersinia pseudotuberculosis*». *Molecular Microbiology* 53, n.º 3 (2004): 871-88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04162.x>.
26. Hu, Dennis X., David M. Withall, Gregory L. Challis, y Regan J. Thomson. «Structure, Chemical Synthesis, and Biosynthesis of Prodiginine Natural Products». *Chemical Reviews* 116, n.º 14 (2016): 7818-53. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00024>.

27. Huda, Noor ul, Noor Hassan, Hazrat Ali, y Yingqian Kang. «Regulation and molecular biology of prodigiosin by *Serratia marcescens*». *Critical Reviews in Biotechnology* 45, n.o 8 (2025): 1680-99.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2025.2529588>.
28. Hünnefeld, Max, Marcus Persicke, Jörn Kalinowski, y Julia Frunzke. «The MarR-Type Regulator MalR Is Involved in Stress-Responsive Cell Envelope Remodeling in *Corynebacterium glutamicum*». *Frontiers in Microbiology* Volume 10-2019 (2019).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01039>.
29. Jia, Xianbo, Fangchen Liu, Ke Zhao, et al. «Identification of Essential Genes Associated With Prodigiosin Production in *Serratia marcescens* FZSF02». *Frontiers in Microbiology* Volume 12-2021 (2021).
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.705853>.
30. Jia, Xianbo, Ke Zhao, Fangchen Liu, Junjie Lin, Chenqiang Lin, y Jichen Chen. «Transcriptional factor OmpR positively regulates prodigiosin biosynthesis in *Serratia marcescens* FZSF02 by binding with the promoter of the prodigiosin cluster». *Frontiers in Microbiology* Volume 13-2022 (2022).
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.1041146>.
31. Khanna, Ashish. «*Serratia Marcescens* - A Rare Opportunistic Nosocomial Pathogen and Measures to Limit Its Spread in Hospitalized Patients». *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*,

advance online publication, 2013.

<https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5010.2737>.

32. Kumarevel, Thirumananseri. «The MarR Family of Transcriptional Regulators - A Structural Perspective». En *Antibiotic Resistant Bacteria - A Continuous Challenge in the New Millennium*, editado por Marina Pana. IntechOpen, 2012. <https://doi.org/10.5772/28565>.

33. Kumarevel, Thirumananseri, Tomoyuki Tanaka, Takashi Umehara, y Shigeyuki Yokoyama. «ST1710–DNA Complex Crystal Structure Reveals the DNA Binding Mechanism of the MarR Family of Regulators». *Nucleic Acids Research* 37, n.º 14 (2009): 4723-35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp496>.

34. Li, Pengpeng, Amy H. Y. Kwok, Jingwei Jiang, et al. «Comparative Genome Analyses of *Serratia marcescens* FS14 Reveals Its High Antagonistic Potential». *PLOS ONE* 10, n.º 4 (2015): e0123061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123061>.

35. Li, Zhen, Lishan Zhang, Qingli Song, et al. «Proteomics Analysis Reveals Bacterial Antibiotics Resistance Mechanism Mediated by ahslyA Against Enoxacin in *Aeromonas hydrophila*». *Frontiers in Microbiology* Volume 12-2021 (2021). <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.699415>.

36. Lin, Chuan-Sheng, Jim-Tong Horng, Chun-Hung Yang, et al. «RssAB-FlhDC-ShlBA as a Major Pathogenesis Pathway in *Serratia Marcescens*». *Infection and Immunity* 78, n.º 11 (2010): 4870-81.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00661-10>.
37. Lin, Junjie, Yanshuang Yu, Ke Zhao, et al. «PtrA regulates prodigiosin synthesis and biological functions in *Serratia marcescens* FZSF02». *Frontiers in Microbiology* Volume 14-2023 (2023).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1240102>.
38. Linehan, Sheena A., Anne Rytönen, Xiu-Jun Yu, Mei Liu, y David W. Holden. «SlyA Regulates Function of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 (SPI-2) and Expression of SPI-2-Associated Genes». *Infection and Immunity* 73, n.º 7 (2005): 4354-62.
<https://doi.org/10.1128/IAI.73.7.4354-4362.2005>.
39. Maglangit, Fleurdeliz, Yi Yu, y Hai Deng. «Bacterial pathogens: threat or treat (a review on bioactive natural products from bacterial pathogens)». *Natural Product Reports* 38, n.º 4 (2021): 782-821.
<https://doi.org/10.1039/d0np00061b>.
40. Michaux, Charlotte, Maurizio Sanguinetti, Fany Reffuveille, et al. «SlyA Is a Transcriptional Regulator Involved in the Virulence of *Enterococcus Faecalis*». *Infection and Immunity* 79, n.º 7 (2011): 2638-45.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01132-10>.
41. Miller, Paul F., y Mark C. Sulavik. «Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*».

- Molecular Microbiology* 21, n.º 3 (1996): 441-48.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02553.x>.
42. Moens, Sara, y Jos Vanderleyden. «Functions of Bacterial Flagella». *Critical Reviews in Microbiology* 22, n.º 2 (1996): 67-100.
<https://doi.org/10.3109/10408419609106456>.
43. Navarre, William Wiley, Steffen Porwollik, Yipeng Wang, et al. «Selective Silencing of Foreign DNA with Low GC Content by the H-NS Protein in *Salmonella*». *Science* 313, n.º 5784 (2006): 236-38.
<https://doi.org/10.1126/science.1128794>.
44. Nazzaro, Gianluca. *Etymologia: Serratia Marcescens - Volume 25, Number 11—November 2019 - Emerging Infectious Diseases Journal - CDC*. s. f. <https://doi.org/10.3201/eid2511.et2511>.
45. Pan, Xuewei, Changhao Sun, Mi Tang, et al. «Loss of Serine-Type D-Ala-D-Ala Carboxypeptidase DacA Enhances Prodigiosin Production in *Serratia marcescens*». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* Volume 7-2019 (2019). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00367>.
46. Pan, Xuewei, Mi Tang, Jiajia You, et al. «PsrA is a novel regulator contributes to antibiotic synthesis, bacterial virulence, cell motility and extracellular polysaccharides production in *Serratia marcescens*». *Nucleic Acids Research* 50, n.º 1 (2022): 127-48.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab1186>.
47. Perera, Inoka C., y Anne Grove. «Molecular Mechanisms of Ligand-Mediated Attenuation of DNA Binding by MarR Family Transcriptional

- Regulators». *Journal of Molecular Cell Biology* 2, n.º 5 (2010): 243-54.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq021>.
48. Poole, K., y V. Braun. «Influence of Growth Temperature and Lipopolysaccharide on Hemolytic Activity of *Serratia Marcescens*». *Journal of Bacteriology* 170, n.º 11 (1988): 5146-52.
<https://doi.org/10.1128/jb.170.11.5146-5152.1988>.
49. Poole, K., E. Schiebel, y V. Braun. «Molecular Characterization of the Hemolysin Determinant of *Serratia Marcescens*». *Journal of Bacteriology* 170, n.º 7 (1988): 3177-88.
<https://doi.org/10.1128/jb.170.7.3177-3188.1988>.
50. Quade, Nick, Chriselle Mendonca, Katharina Herbst, et al. «Structural Basis for Intrinsic Thermosensing by the Master Virulence Regulator RovA of *Yersinia**». *Journal of Biological Chemistry* 287, n.º 43 (2012): 35796-803. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.379156>.
51. Rafiq, Muhammad, Noor ul Huda, Noor Hassan, et al. «Microbial prodigiosin shows broad-spectrum bioactivity confirmed by experimental and computational analyses». *Frontiers in Microbiology* Volume 16-2025 (2025). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1676959>.
52. Ricardez-García, Carolina, y Salvador Uribe-Carvajal. «Las urbes microscópicas donde coexisten bacterias y levaduras». *Revista de la Facultad de Medicina* 68, n.º 6 (2025): 50.
<https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2025.68.6.07>.
53. Rice, S. A., K. S. Koh, S. Y. Queck, M. Labbate, K. W. Lam, y S. Kjelleberg. «Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia Marcescens*

- Are Controlled by *Quorum Sensing* and Nutrient Cues». *Journal of Bacteriology* 187, n.º 10 (2005): 3477-85.
<https://doi.org/10.1128/JB.187.10.3477-3485.2005>.
54. Rodionov, Dmitry A., Pavel S. Novichkov, Elena D. Stavrovskaya, et al. «Comparative genomic reconstruction of transcriptional networks controlling central metabolism in the *Shewanella* genus». *BMC Genomics* 12, n.º 1 (2011): S3. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-S1-S3>.
55. Sandner-Miranda, Luisa, Pablo Vinuesa, Alejandro Cravioto, y Rosario Morales-Espinosa. «The Genomic Basis of Intrinsic and Acquired Antibiotic Resistance in the Genus *Serratia*». *Frontiers in Microbiology* Volume 9-2018 (2018). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00828>.
56. Saralegui, Claudia, Manuel Ponce-Alonso, Blanca Pérez-Viso, et al. «Genomics of *Serratia marcescens* Isolates Causing Outbreaks in the Same Pediatric Unit 47 Years Apart: Position in an Updated Phylogeny of the Species». *Frontiers in Microbiology* Volume 11-2020 (2020). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00451>.
57. Sethupathy, Sivasamy, Ezhaveni Sathiyamoorthi, Yong-Guy Kim, Jin-Hyung Lee, y Jintae Lee. «Antibiofilm and Antivirulence Properties of Indoles Against *Serratia marcescens*». *Frontiers in Microbiology* Volume 11-2020 (2020).
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2020.584812>.

58. Shanks, Robert M. Q., Nicholas A. Stella, Roni M. Lahr, et al. «Suppressor analysis of eepR mutant defects reveals coordinate regulation of secondary metabolites and serralysin biosynthesis by EepR and HexS». En *Microbiology*, vol. 163. n.º 2. Microbiology Society, 2017. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000422>.
59. Shanks, Robert M. Q., Roni M. Lahr, Nicholas A. Stella, et al. «A *Serratia marcescens* PigP Homolog Controls Prodigiosin Biosynthesis, Swarming Motility and Hemolysis and Is Regulated by cAMP-CRP and HexS». *PLOS ONE* 8, n.º 3 (2013): e57634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057634>.
60. Shanks, Robert M. Q., Nicholas A. Stella, Kristin M. Hunt, Kimberly M. Brothers, Liang Zhang, y Patrick H. Thibodeau. «Identification of SlpB, a Cytotoxic Protease from *Serratia Marcescens*». *Infection and Immunity* 83, n.º 7 (2015): 2907-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.03096-14>.
61. Shikov, Anton E., Anastasiya V. Merkusheva, Iuliia A. Savina, Anton A. Nizhnikov, y Kirill S. Antonets. «The man, the plant, and the insect: shooting host specificity determinants in *Serratia marcescens* pangenome». *Frontiers in Microbiology* Volume 14-2023 (2023). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1211999>.
62. Shimuta, Ken, Makoto Ohnishi, Sunao Iyoda, Naomasa Gotoh, Nobuo Koizumi, y Haruo Watanabe. «The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhlA) depend on

- lysophospholipid production by PhlA». *BMC Microbiology* 9, n.º 1 (2009): 261. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-261>.
63. Stapleton, Melanie R., Valia A. Norte, Robert C. Read, y Jeffrey Green. «Interaction of the *Salmonella typhimurium* Transcription and Virulence Factor SlyA with Target DNA and Identification of Members of the SlyA Regulon *». *Journal of Biological Chemistry* 277, n.º 20 (2002): 17630-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110178200>.
64. Sulavik, Mark C., Laura F. Gambino, y Paul F. Miller. «The MarR Repressor of the Multiple Antibiotic Resistance (mar) Operon in *Escherichia coli*: Prototypic Member of a Family of Bacterial Regulatory Proteins Involved in Sensing Phenolic Compounds». *Molecular Medicine* 1, n.º 4 (1995): 436-46. <https://doi.org/10.1007/BF03401581>.
65. Tran, Hien J., Ann Kathrin Heroven, Lars Winkler, Thomas Spreter, Birgitta Beatrix, y Petra Dersch. «Analysis of RovA, a Transcriptional Regulator of *Yersinia pseudotuberculosis* Virulence That Acts through Antirepression and Direct Transcriptional Activation*». *Journal of Biological Chemistry* 280, n.º 51 (2005): 42423-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504464200>.
66. Vergalli, Julia, Igor V. Bodrenko, Muriel Masi, et al. «Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria». *Nature Reviews Microbiology* 18, n.º 3 (2020): 164-76. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0294-2>.
67. Wang, Dan, Changjiang Guo, Longjiang Gu, y Xiaohui Zhang. «Comparative study of the marR genes within the family

- Enterobacteriaceae». *Journal of Microbiology* 52, n.º 6 (2014): 452-59.
<https://doi.org/10.1007/s12275-014-3586-2>.
68. Wei Ke, Tang Dong-Jie, He Yong-Qiang, et al. «hpaR, a Putative marR Family Transcriptional Regulator, Is Positively Controlled by HrpG and HrpX and Involved in the Pathogenesis, Hypersensitive Response, and Extracellular Protease Production of *Xanthomonas campestris* Pathovar *campestris*». *Journal of Bacteriology* 189, n.º 5 (2007): 2055-62. <https://doi.org/10.1128/jb.01331-06>.
69. Whitchurch, Cynthia B., Tim Tolker-Nielsen, Paula C. Ragas, y John S. Mattick. «Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation». *Science* 295, n.º 5559 (2002): 1487-1487.
<https://doi.org/10.1126/science.295.5559.1487>.
70. Wilkinson, Steven P., y Anne Grove. «Ligand-responsive Transcriptional Regulation by Members of the MarR Family of Winged Helix Proteins». *Current Issues in Molecular Biology* 8, n.º 1 (2006): 51-62.
<https://doi.org/10.21775/cimb.008.051>.
71. Will, W. Ryan, Peter Brzovic, Isolde Le Trong, et al. «The Evolution of SlyA/RovA Transcription Factors From Repressors to Counter-Silencers in *Enterobacteriaceae*». *bioRxiv*, 1 de enero de 2018, 369546. <https://doi.org/10.1101/369546>.
72. Will, W. Ryan, y Ferric C. Fang. «The MarR Family Transcription Factor SlyA Senses Iron and Respiratory Status in Enteric Bacteria». *mBio* 16, n.º 10 (2025): e01396-25. <https://doi.org/10.1128/mbio.01396-25>.

73. Williams, David J., Patrick A. D. Grimont, Adrián Cazares, et al. «The genus *Serratia* revisited by genomics». *Nature Communications* 13, n.º 1 (2022): 5195. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32929-2>.
74. Wyborn, Neil R., Melanie R. Stapleton, Valia A. Norte, Ruth E. Roberts, Jamie Grafton, y Jeffrey Green. «Regulation of *Escherichia Coli* Hemolysin E Expression by H-NS and *Salmonella* SlyA». *Journal of Bacteriology* 186, n.º 6 (2004): 1620-28. <https://doi.org/10.1128/JB.186.6.1620-1628.2004>.
75. Xiang, Tingting, Wei Zhou, Cailing Xu, et al. «Transcriptomic Analysis Reveals Competitive Growth Advantage of Non-pigmented *Serratia marcescens* Mutants». *Frontiers in Microbiology* Volume 12-2021 (2022). <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.793202>.
76. Yip, Chee-Hoo, Sobina Mahalingam, Kiew-Lian Wan, y Sheila Nathan. «Prodigiosin Inhibits Bacterial Growth and Virulence Factors as a Potential Physiological Response to Interspecies Competition». *PLOS ONE* 16, n.º 6 (2021): e0253445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253445>.
77. Yoon, Hyunjin, Jason E. McDermott, Steffen Porwollik, Michael McClelland, y Fred Heffron. «Coordinated Regulation of Virulence during Systemic Infection of *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*». *PLOS Pathogens* 5, n.º 2 (2009): e1000306. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000306>.

78. Zhang, Yan, Tong Cao, Jie Zheng, et al. «Emergence of high-risk ST595 and ST640 clones of carbapenem-resistant *Serratia marcescens*: insights from genomic and virulence profiling during a nosocomial epidemic». *Frontiers in Microbiology* Volume 16-2025 (2025). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1681911>.
79. Zhu, Wentao, Xi Chen, Hong Shen, Ming Wei, Li Gu, y Qian Liu. «Genomic evolution, antimicrobial resistance, and dissemination of global *Serratia spp.* unveil increasing species diversity and carbapenemae-resistance: A retrospective and genomic epidemiology study». *Current Research in Microbial Sciences* 9 (enero de 2025): 100456. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2025.100456>.
80. Zivkovic Zaric, Radica, Milan Zaric, Marija Sekulic, et al. «Antimicrobial Treatment of *Serratia marcescens* Invasive Infections: Systematic Review». *Antibiotics* 12, n.º 2 (2023): 367. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020367>.