

## Efecto de la mutación en el carboxilo-terminal de la isocitrato liasa (ICL) de *Pseudomonas aeruginosa* sobre patogenicidad de la bacteria

Effect of carboxyl-terminal mutation of isocitrate lyase (ICL) from *Pseudomonas aeruginosa* in pathogenicity of bacterium

Roxana Yughadi Gaona-García<sup>\*1</sup>, Alma Laura Díaz-Pérez<sup>1</sup>, César Díaz-Pérez<sup>2</sup> y Jesús Campos-García<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. U-3, Ciudad Universitaria, 58030 Morelia, Mich., México

<sup>2</sup> Facultad de Agrobiología, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México.  
1608187d@umich.mx<sup>\*1</sup>

### Resumen

Para poder crecer en sustratos no gluconeogénicos, la isocitrato liasa, la primera enzima del ciclo del glioxilato, redirecciona al isocitrato alejándolo del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (CAT) y dirigiéndolo hacia el ciclo del glioxilato. La ICL de *Pseudomonas aeruginosa* (PaICL) es considerada como un factor de virulencia debido a su función en la asimilación de carbono durante la infección. El extremo carboxilo (C-terminal) de las ICLs de la subfamilia 1 está relacionado con la función enzimática, por lo que propusimos determinar la función del C-terminal en la función de la PaICL y si está involucrado en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1. El C-terminal de la PaICL se modificó por la adición de una etiqueta de histidinas, generando a la CILC. También se generó a la NICL, que corresponde a la PaICL con una etiqueta de histidinas en el extremo amino. La CILC fue menos eficiente que la NICL; sin embargo, no se reflejó en el crecimiento de la mutante A39 complementada con la CILC, ya que creció en acetato en la misma proporción que PAO1. Se determinó que las interacciones iónicas son críticas para la estabilización del homotetrámero de la PaICL. Además, el homotetrámero de la CILC fue menos estable, sugiriendo que el C-terminal es importante para la conformación cuaternaria de la enzima. La mutante A39 complementada con las variantes de la PaICL fue más virulenta que la cepa PAO1. Estos resultados confirman que en *P. aeruginosa* la ICL es esencial para la asimilación de acetato y virulencia.

### Abstract

To be able to grow on non-gluconeogenic substrates, isocitrate lyase, the first enzyme of the glyoxylate cycle, redirects isocitrate away from the tricarboxylic acid cycle (TCA) and towards the glyoxylate cycle. The isocitrate lyase from *Pseudomonas aeruginosa* (PaICL) is considered a virulence factor due to its role in carbon assimilation during infection. The carboxyl terminus (C-terminal) of ICLs from subfamily 1 is related to enzymatic function, so we proposed to determine the role of the C-terminal in PaICL function and whether it is involved in the virulence of *P. aeruginosa* PAO1. The C-terminal of PaICL was modified by adding a histidine tag, generating CILC. NICL was also generated, that is a PaICL with a histidine tag at the amino terminus. CILC was less efficient than NICL; however, this was not reflected in the growth of the A39 mutant complemented with CILC, as it grew on acetate at the same rate as PAO1. It was determined that ionic interactions are critical for the stabilization of the PaICL homotetramer. Furthermore, the CILC homotetramer was less stable, suggesting that the C-terminal is important for the quaternary conformation of the enzyme. The A39 mutant complemented with PaICL variants was more virulent than the PAO1 strain. These results confirm that in *P. aeruginosa*, ICL is essential for acetate assimilation and virulence.

**Palabras clave:** isocitrato liasa, extremo carboxilo, homotetrámero, virulencia.

## Introducción

La capacidad de adquirir y asimilar nutrientes es clave para la exitosa colonización microbiana, dado que, todos los microorganismos requieren de una fuente de carbono y energía para crecer y multiplicarse, permitiendo que microorganismos puedan sobrevivir en la mayoría de los nichos ambientales, incluyendo nichos específicos dentro de organismos hospederos, por lo que también puede contribuir con la patogenicidad de las bacterias (Somerville y Proctor, 2009; Campilongo *et al.* 2017).

Los carbohidratos son de las principales fuentes de carbono y energía y se metabolizan hacia piruvato, el cual puede seguir dos vías. La primera genera energía mediante el intermediario acetil-CoA, que al entrar al ciclo de los ácidos tricarbóxicos (CAT) se oxida completamente a CO<sub>2</sub> generando NADH<sub>2</sub> y FADH<sub>2</sub> (Figura 1) En el CAT, el carbono del acetil-CoA se pierde como CO<sub>2</sub> en las dos reacciones de descarboxilación del ciclo, por lo que en esta ruta no hay asimilación neta de carbono para generar biomasa (Dolan *et al.* 2018). La segunda vía que sigue el piruvato va dirigida hacia la conservación de carbono para la generación de biomasa, ya que el piruvato al ser un intermediario gluconeogénico contribuye para la síntesis de glucosa vía el oxalacetato (Murima *et al.* 2016). Las fuentes de carbono no gluconeogénicas, como ácidos grasos y el aminoácido (AA) cetogénico leucina, producen principalmente como intermediario metabólico al acetil-CoA, como ya se mencionó anteriormente, a partir de este intermediario no se genera biomasa para el crecimiento (Dunn *et al.* 2009. Este problema de asimilación de carbono es resuelto por *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras bacterias, mediante la activación del ciclo del glioxilato (Figura 1).

El ciclo del glioxilato consiste en cinco reacciones, tres de las cuales se comparten con el CAT (evitando las reacciones de pérdida de carbono del CAT). Las dos reacciones restantes son exclusivas de este ciclo y forman parte de la derivación del glioxilato, que hace referencia a la bifurcación que sufre el isocitrato, alejándolo del CAT y llevándolo hacia la producción de malato y succinato (Dunn *et al.* 2009; Campilongo *et al.* 2017; Dolan *et al.* 2018). En la primera de estas reacciones, la isocitrato liasa (ICL) cataliza el rompimiento del isocitrato a glioxilato (Figura 1) (Dunn *et al.* 2009; Dolan *et al.* 2018).

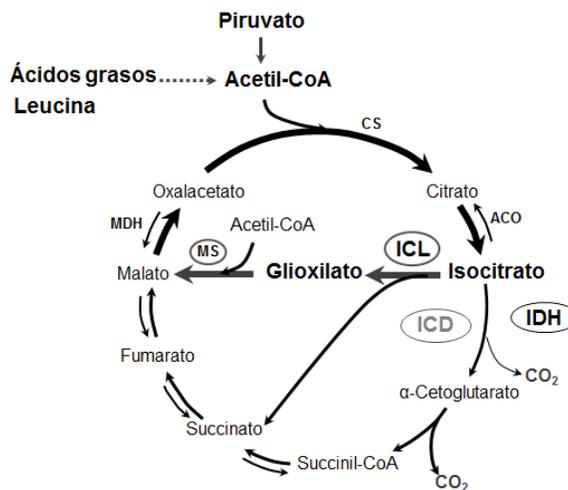


Figura 1. Ciclo del glioxilato en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. El ciclo del glioxilato se activa bajo fuentes de carbono no gluconeogénicas como los ácidos grasos y la leucina y contribuye a la conservación de carbono para la generación de biomasa para el crecimiento. El ciclo consta de cinco reacciones, tres son compartidas con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y dos reacciones son exclusivas del ciclo del glioxilato. CS, citrato sintasa; IDH, isocitrato deshidrogenasa insensible a AceK; ICD, isocitrato deshidrogenasa sensible a AceK; ICL, isocitrato liasa; MS, malato sintasa, MDH, malato deshidrogenasa. Elaboración propia.

La ICL, debido a la función que desempeña en el metabolismo del carbono, participa en la patogenicidad bacteriana. La ICL de *P. aeruginosa* es esencial para el establecimiento de infecciones crónicas, ya que la mutación en el gen que codifica a la ICL de *P. aeruginosa* (PaICL) generalmente lleva a la incapacidad para mantener la infección, sobre todo en el modelo de infección pulmonar (Hoboth *et al.* 2009). El ambiente pulmonar contiene lípidos provenientes de la

fosfatidilcolina (Fahnoe *et al.* 2012), de modo que el microorganismo debe redireccionar su metabolismo para utilizar estos nutrientes, por lo que la ICL es necesaria para la adaptación al hospedero (Hagins *et al.* 2011; Fahnoe *et al.* 2012). La ICL de *P. aeruginosa* es considerada como un factor de virulencia y sumado al hecho de que no se encuentran ortólogos de la ICL en mamíferos, hacen de esta enzima un blanco para el desarrollo de nuevas vacunas e inhibidores específicos (Thomas *et al.* 2000; Dolan *et al.* 2018), por lo que es importante conocer a profundidad la estructura de la enzima, con la finalidad de contribuir en el desarrollo de nuevas de terapias antimicrobianas.

La familia AceA/ICL se compone de cinco subfamilias que albergan a las ICLs pertenecientes a nemátodos, hongos, plantas, arqueas y a diversas clases bacterianas. La subfamilia 1 se integra principalmente por las ICLs pequeñas provenientes de bacterias. A esta subfamilia pertenece la ICL de *Escherichia coli* (EcICL) y las ICLs de la mayoría de los miembros del género *Pseudomonas*. La subfamilia 2 comprende a ICLs de eucariontes de los reinos *Fungi* y *Plantae*. La subfamilia 3 se integra por las ICLs de más de 550 AA provenientes de bacterias, a esta familia pertenece la PaICL. La subfamilia 4 incluye a las ICLs de *Archea* y un pequeño grupo de ICLs principalmente de *Mycobacterium* dan origen a la subfamilia 5 (Campos-García *et al.* 2013).

La función del extremo carboxilo de la ICL se ha estudiado en miembros de la subfamilia 1, encontrando que puede tener relación con la función enzimática. En la EcICL, el extremo carboxilo (C-terminal) tiene relación con la actividad enzimática, ya que la delección de la H429 del C-terminal originó la pérdida de la función enzimática, al igual que la inserción de un heptapéptido (Gly-Met-Pro-Ala-Gly-Arg-Leu). En la ICL de *P. indigofera*, esta región también presentó relación con la actividad enzimática, ya que la delección de los AA Phe e His, localizados en el C-terminal ocasionaron la pérdida de la función (Matsuoka *et al.* 1988). En la ICL de *Mycobacterium tuberculosis*, la delección de las hélices  $\alpha_{12}$ ,  $\alpha_{13}$  y  $\alpha_{14}$ , que conforman la región del extremo carboxilo, afectó la función de ICL, pero no su estado de oligomerización. Estos resultados indican que la región del extremo carboxilo de la PaICL probablemente se relaciona con la función de la enzima.

Los extremos amino y carboxilo en el protómero de la PaICL se localizan alejados del sitio catalítico; sin embargo, en el homotetrámero, el C-terminal de una subunidad se localiza cerca del sitio catalítico de la subunidad vecina, por lo que es probable que cualquier inserción en el C-terminal ocasione una alteración en la función de la PaICL, ya que puede obstruir el sitio catalítico, o bien, el motivo adicionado se estaría localizando en una zona de amplio contacto entre subunidades, lo que podría ocasionar la desestabilización del homotetrámero, llevando a la pérdida de la función.

En *P. aeruginosa* el gen que codifica a la ICL se identificó en la mutante A39, la cual fue incapaz de crecer en acetato. La región mutada en la mutante A39 correspondió al ORF PA2634, el presentó similitud de secuencia con genes *aceA* que codifican para la ICL involucrada en el ciclo del glioxilato (Díaz-Pérez *et al.* 2007). El ORF PA2634 se nombró como gen *aceA*, el cual codifica para una proteína de 531 AA con un peso molecular (PM) teórico de 58.8 kDa y cuyo estado oligomérico corresponde a un homotetrámero de 231 kDa (Díaz-Pérez *et al.* 2007; Crousilles *et al.* 2018).

## Metodología

### Clonación, complementación y purificación de proteínas

Para llevar a cabo este trabajo ya se contaba con los plásmidos pCDICL, pTICL y pRR2634, el primero origina a la PaICL con una etiqueta de histidinas (E-His<sub>6</sub>) en el extremo amino terminal (N-terminal) para facilitar la purificación de la proteína; esta proteína se nombró NICL (Figura 2). El segundo plásmido origina la PaICL etiquetada en el C-terminal; esta proteína se nombró CICL. El plásmido pR2634 corresponde al plásmido pUCP20 con un fragmento de 2 kb que contiene al gen *aceA* con su región promotora, el cual se replica en *P. aeruginosa* y se utilizó para la complementación de la mutante A39. La NICL y la CICL se subclonaron en el plásmido pUCP20 para la complementación de la mutante A39.

Las proteínas se purificaron mediante cromatografía de afinidad y los parámetros cinéticos se determinaron de acuerdo con lo reportado por Díaz-Pérez *et al.* (2013). El estado oligomérico de las proteínas se determinó mediante Blue Native-PAGE (BN-PAGE) sin gradiente (Witting *et al.*, 2006).

## Determinación de los factores de virulencia

La determinación de los factores de virulencia se realizó en caldo LB y en medio M9 con acetato de sodio al 0.3% y 0.02% de peptona de caseína. La densidad celular se determinó a 600 nm y se utilizó para reportar los factores de virulencia por la densidad celular. Los factores que se determinaron fueron la movilidad tipo swimming, piocianina (Essar et al., 1990), pioverdina (Hoegy et al., 2014), pioquelina (Hoegy et al., 2014) y ramnolípidos (Behrens et al., 2016).

## Determinación de la virulencia in vivo

Los ensayos de supervivencia del nemátodo *Caenorhabditis elegans* se realizaron con la cepa Bristol N2. Los nemátodos se sincronizaron con el método de hipoclorito alcalino (Porta-de-la-Riva et al., 2012). Los nemátodos en estado L4 se colocaron en placas de 20 pozos que contenían células bacterianas a una  $DO_{600}$  de  $\sim 0.3$  en medio de muerte líquida (Kirienko et al., 2014). Las células bacterianas se crecieron durante 12 h o 24 h en LB o medio M9 con acetato al 0.3%. Las placas se incubaron y se registró el número de nemátodos vivos por conteo directo. Los nemátodos se consideraron muertos cuando permanecieron inmóviles incluso después de agitar la placa (Park et al., 2017).

## Resultados y discusión

### Función del C-terminal en la función de la PaICL

Para estudiar la función del C-terminal de la PaICL se propuso que la adición de un polipéptido en el C-terminal de la enzima podría ocasionar la pérdida de su función, como se reportó para la EcICL (Matsuoka et al. 1988). El gen *aceA* clonado en el vector pTRCHis2A origina a la PaICL con una E-His<sub>6</sub> en el C-terminal, a esta enzima se le denominó CICL. La CICL purificada mostró un PM mayor al esperado (Figura 2), esto puede deberse a las histidinas de la etiqueta, ya que pueden retardar la movilidad de las proteínas de fusión en el SDS-PAGE ocasionando una variación en el peso molecular (Gou et al., 2013).

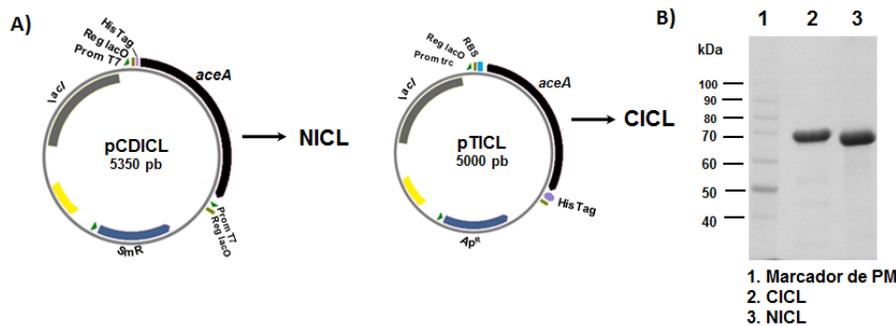


Figura 2. Enzimas isocitrato liasas recombinantes. A). Los plásmidos pCDICL y pTICL generan a las enzimas isocitrato liasas (ICL) con una etiqueta en el extremo amino (NICL) y en el extremo carboxilo (CICL), respectivamente. B). Purificación de las isocitrato liasas recombinantes. La NICL y CICL se purificaron mediante cromatografía de afinidad y mediante SDS-PAGE se verificó la purificación de las enzimas. Tomado de: Study of peripheral domains in structure-function of isocitrate lyase (ICL) from *Pseudomonas aeruginosa* <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03768-0>.

La influencia de la E-His<sub>6</sub> en el C-terminal de la CICL se evaluó mediante los parámetros cinéticos de la CICL, usando NICL como control. Ambas enzimas mostraron una cinética de tipo Michaelis-Menten, la cual se confirmó mediante la gráfica de Lineweaver-Burk. La CICL mostró una menor afinidad por el sustrato, debido a que su  $K_m$  fue mayor a la de la NICL, mientras que la  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  y  $K_m/k_{cat}$  fueron menores para la CICL, indicando que esta enzima es menos eficiente para realizar la catálisis. Los parámetros óptimos de temperatura y pH fueron similares para ambas enzimas. La estabilidad de las enzimas se determinó mediante el tiempo de vida medio ( $t_{1/2}$ ) a 45°C, el cual fue similar para ambas enzimas. Estos resultados indican que la E-His<sub>6</sub> adicionada en el C-terminal afectó la función de la PaICL, pero no la termoestabilidad de la PaICL. Para determinar si la menor eficiencia de la CICL podría afectar el crecimiento de la bacteria en acetato, se complementó la mutante A39 con el plásmido pRCICL. La mutante complementada creció al mismo nivel que la mutante complementada con la NICL (A39/pRNICL) o con el gen silvestre (A39/pRR2634).

Mediante BN-PAGE se probó si la E-His<sub>6</sub> en el C-terminal podría afectar el estado de oligomerización de la CIICL. La CIICL mostró un PM ~220 kDa, indicando que es un homotetrámero al igual que la NIICL, lo que concuerda con la estructura cuaternaria para las ICLs reportadas (Eprintsev et al., 2014). Diferentes fuerzas pueden contribuir para estabilizar la estructura cuaternaria de las proteínas, incluyendo interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro (Walden et al., 2001). Para probar si E-His<sub>6</sub> en el C-terminal podría desestabilizar a las interacciones que mantienen al homotetrámero unido, las enzimas se incubaron con compuestos que rompen diferentes interacciones. Su utilizaron Tritón X-100 y digitonina para probar las interacciones hidrofóbicas y DTT y el detergente SDS para probar los puentes disulfuro e interacciones iónicas, respectivamente. La desestabilización del homotetrámero de la NIICL y la CIICL se observó solo con SDS, manifestándose como la disminución en la intensidad de las bandas correspondientes a los homotetrámeros en el gel BN-PAGE. Este efecto ocurrió a todas las concentraciones probadas de SDS y fue más pronunciado para la CIICL (Figura 3). Además, se observó la aparición de dos bandas adicionales cercanas al PM teórico del monómero y del dímero de la PaICL, 58.9 kDa y 119.6 kDa, respectivamente (Figura 2). Estos resultados indican que las interacciones iónicas son esenciales en la estabilización del homotetrámero de la PaICL y que la CIICL es una enzima menos estable que la NIICL.

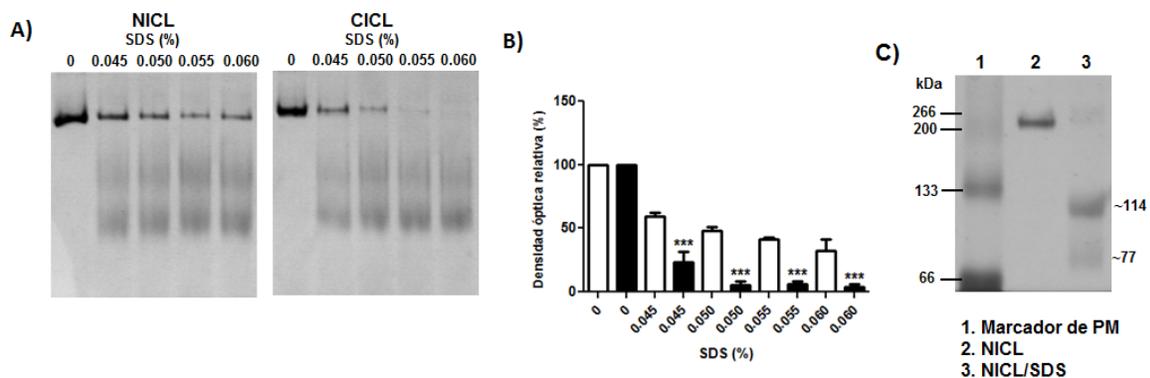


Figura 3. Desestabilización de la estructura cuaternaria de las isocitrato liasas recombinantes. A). Determinación de interacciones electrostáticas. La NIICL y la CIICL se incubaron con concentraciones crecientes de SDS, el cual desestabiliza interacciones electrostáticas entre protómeros. Posteriormente las enzimas se resolvieron mediante BN-PAGE. B). Densitometría de las bandas observadas en el BN-PAGE. C) Desestabilización de la NIICL mediante SDS. Después de incubarla a la NIICL con SDS, se resolvió en un gel BN-PAGE y se determinó el peso molecular de las bandas resultantes del proceso de desnaturalización. Los valores representan la media  $\pm$ SEM de n=3. ANOVA una vía, seguido de un test de Bonferroni. \*\*\*P <0.001. Tomado de: Study of peripheral domains in structure-function of isocitrate lyase (ICL) from *Pseudomonas aeruginosa* <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03768-0>.

### Efecto del C-terminal de la PaICL sobre la virulencia de la bacteria

Se propuso determinar si la E-His<sub>6</sub> en el C-terminal y en el N-terminal de la PaICL podría afectar la virulencia de *P. aeruginosa*, debido a la función que desempeña la enzima en el metabolismo del carbono. La virulencia se determinó en la mutante A39 complementada, la cual sobreexpresa a las diferentes variantes de la PaICL (Figura 4).

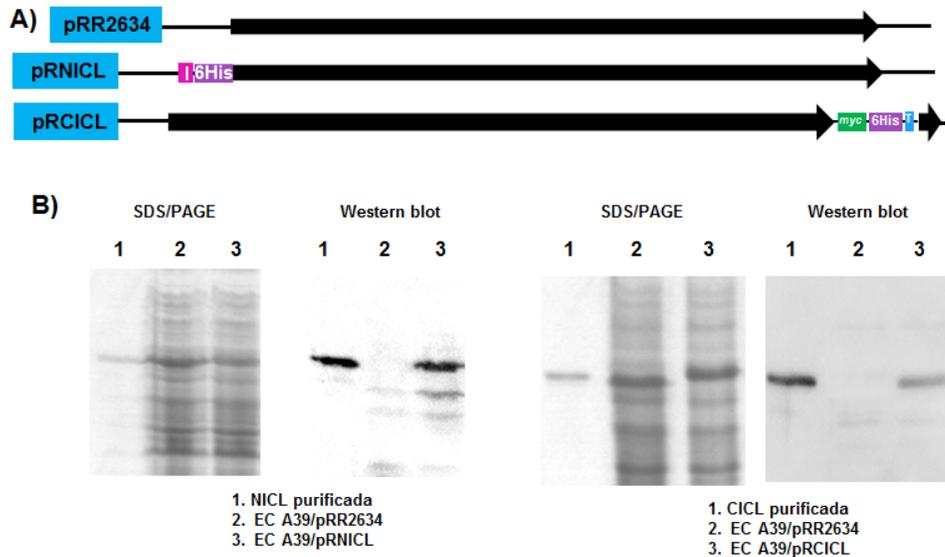


Figura 4. Complementación de la mutante A39. A). Plásmidos con las diferentes variantes de la isocitrato liasa utilizados para la complementación de la mutante A39. El plásmido pRR2634 genera a la ICL de *P.aeruginosa* PAO1, los plásmidos pRNICL y pRCICL generan a la NICL y CICL, respectivamente. B). Expresión de las isocitrato liasas recombinantes. La NICL y la ICL se detectaron en la fase soluble de extractos crudos de la mutante A39 complementada con el correspondiente plásmido. La detección se realizó mediante western blot utilizando un anticuerpo contra la etiqueta de histidinas (E-His<sub>6</sub>). Tomado de: Study of peripheral domains in structure-function of isocitrate lyase (ICL) from *Pseudomonas aeruginosa* <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03768-0>.

La virulencia se probó in vitro mediante la producción de los factores de virulencia en LB y en medio M9 suplementado con acetato, en la fase estacionaria temprana y tardía. Los resultados indican que, aunque la PaICL, NICL y CICL fueron esenciales para el crecimiento de mutante A39 en acetato, estas no afectan la producción de los factores de virulencia probados, ya que no se observó ninguna diferencia entre *P. aeruginosa* PAO1 y la mutante A39 complementada con las diferentes variantes de la PaICL en ninguno de los factores de virulencia probados. Estos resultados concuerdan a lo observado con la mutante *aceA* derivada de *P. aeruginosa* FRD1, la cual en LB produjo piocianina y pioverdina al mismo nivel que FRD1 (Lindsey et al., 2008). Estos resultados también son consistentes con lo reportado por Bartell et al. (2017), quien realizó una reconstrucción de la red metabólica a escala del genoma de *P. aeruginosa* P14 para elucidar la interconectividad entre la síntesis de factores de virulencia y el crecimiento, encontrando que la ICL no afecta la síntesis de factores de crecimiento. La virulencia de la mutante A39 que sobreexpresa a las variantes de la PaICL también se determinó mediante ensayos de supervivencia de *C. elegans* usando células bacterianas vivas obtenidas de cultivos crecidos en LB durante 12 y 24 h (Figura 5). Se observó que la mutante A39 no fue capaz de matar nemátodos, indicando que no fue virulenta. Este fenotipo de la mutante A39 concuerda con lo reportado para varios modelos in vivo (Lindsey et al., 2008; Fahnoe et al., 2012; Depke et al., 2020). En las cinéticas de supervivencia se observó que la mutante A39 que sobreexpresa a la NICL, a la CICL o la PaICL presentaron un menor porcentaje de supervivencia de los nemátodos, indicando que fueron más virulentas en comparación a PAO1, este efecto fue más pronunciado con células bacterianas provenientes de cultivos crecidos durante 24 h, ya que las 72 h ~10% de los nemátodos sobrevivieron, mientras que con PAO1 sobrevivieron ~40% (Figura 5). Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de la NICL, la CICL y la PaICL aumentó la virulencia de PAO1 y que el C-terminal no altera la virulencia de la bacteria en el modelo de *C. elegans*. Se ha observado que la expresión constitutiva de la PaICL es común en aislados de *P. aeruginosa* provenientes de infección crónica de pacientes con fibrosis quística (Fahnoe et al., 2012).

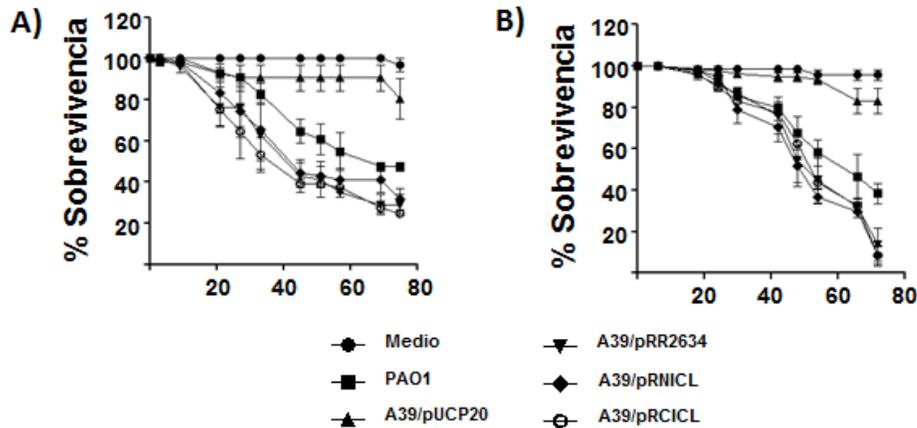


Figura 5. Cinéticas de sobrevivencia de *C. elegans* frente a células de la mutante A39 complementada. Los nemátodos fueron confrontados con células vivas de la mutante A39 complementada con las diferentes variantes de la ICL. A) Cinética de sobrevivencia con cultivos de 12 h. B) Cinéticas de sobrevivencia con cultivos de 24 h. Los valores son la media  $\pm$  SEM de  $n=4$ . Tomado de: Study of peripheral domains in structure-function of isocitrate lyase (ICL) from *Pseudomonas aeruginosa* <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03768-0>.

## Conclusiones

El extremo carboxílico de la PaICL modificó la eficiencia de la enzima, volviéndola menos eficiente para realizar la catálisis enzimática; además, este extremo contribuye en la estabilización del homotetrámero de la PaICL y la hace más estable en presencia de agentes que rompen interacciones iónicas pues las interacciones iónicas son críticas para mantener la estructura cuaternaria de la PaICL. La adición de la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo de la PaICL no afectó la producción de los factores de virulencia evaluados en este trabajo, sin embargo, hace falta evaluar la producción de otros factores de virulencia. Por otra parte, no afecta el desempeño de la enzima en un modelo in vivo, debido a que la virulencia no se ve aumentada en las mutantes complementadas.

## Agradecimientos

Agradezco a la UMSNH y al laboratorio de Biotecnología Microbiana del IIQB por brindarnos todos los recursos necesarios para realizar este trabajo, así como la Universidad de Guanajuato por permitir la publicación del mismo. Este trabajo fue posible con los fondos provenientes de los proyectos: Convocatoria Institucional de Investigación Científica 2024 de la Universidad de Guanajuato, proyecto 064/2024.

## Bibliografía/Referencias

- Bartell JA, Blazier AS, Yen P, Thøgersen JC, Jelsbak L, Goldberg JB, Papin JA (2017) Reconstruction of the metabolic network of *pseudomonas aeruginosa* to interrogate virulence factor synthesis. *Nat Commun* 8:14631. doi: 10.1038/ncomms14631.
- Behrens B, Engelen J, Tiso T, Blank LM, Hayen H (2016) Characterization of rhamnolipids by liquid chromatography/mass spectrometry after solid-phase extraction. *Anal Bioanal Chem* 408:2505–2514. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9353-y>.
- Campilongo R et al (2017) One ligand, two regulators and three binding sites: how KDPG controls primary carbon metabolism in *Pseudomonas*. *PLoS Genet* 13:e1006839. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006839>
- Campos-García J, Díaz-Pérez C, Díaz-Pérez AL (2013) Residues Asn214, Gln211, Glu219 and Gln221 contained in the subfamily 3 catalytic signature of the isocitrate lyase from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in its catalytic and thermal properties. *World J Microbiol Biotechnol* 29:991–999. doi: 10.1007/s11274-013-1258-8.
- Crousilles A, Dolan SK, Brear P, Chirgadzé DY, Welch M (2018) Gluconeogenic precursor availability regulates flux through the glyoxylate shunt in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 293:14260–14269. DOI 10.1074/jbc.RA118.004514.

- Depke T, Thöming JG, Kordes A, Häussler S, Brönstrup M (2020) Untargeted LC-MS metabolomics differentiates between virulent and avirulent clinical strains of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Biomolecules* 10:1041. <https://doi.org/10.3390/biom10071041>.
- Díaz-Pérez AL, Román-Doval C, Díaz-Pérez C, Cervantes C, Sosa-Aguirre CR, López-Meza JE, Campos-García J (2007) Identification of the *aceA* gene encoding isocitrate lyase required for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* on acetate, acyclic terpenes and leucine. *FEMS Microbiol Lett* 269:309–316. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00654.x>.
- Dolan SK, Welch M (2018) The glyoxylate shunt, 60 years. *Annu Rev Microbiol* 72:309–330. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062257>.
- Dunn M, Ramirez-Trujillo J, Hernández-Lucas I (2009) Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology* 155:3166–3175. [10.1099/mic.0.030858-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.030858-0).
- Eprintsev A, Salnikov A, Haba A, Zaichikova M (2014) Isocitrate lyase isozymes and their role in organisms with different levels of organization. *Biol Bull Rev* 4:323–334. <https://doi.org/10.1134/S2079086414040021>.
- Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford I (1990) Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* 172:884–900. <https://doi.org/10.1128/jb.172.2.884-900.1990>.
- Fahnoe KC, Flanagan ME, Gibson G, Shanmugasundaram V, Che Y, Tomaras AP (2012) Non-traditional antibacterial screening approaches for the identification of novel inhibitors of the glyoxylate shunt in gram-negative pathogens. *PLoS ONE* 7:e51732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051732>.
- Guo J, Xu L, Su Y, Wang H, Gao S, Xu J, Que Y (2013) ScMT2-1-3, a metallothionein gene of sugarcane, plays an important role in the regulation of heavy metal tolerance/accumulation. *BioMed Res Int*. <https://doi.org/10.1155/2013/904769>.
- Hagins JM, Scofield J, Suh S-J, Silo-Suh L (2011) Malate synthase expression is deregulated in the *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate FRD1. *Can J Microbiol* 57:186–195. <https://doi.org/10.1155/2013/904769>.
- Hoboth C et al (2009) Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 200:118–130. <https://doi.org/10.1086/599360>.
- Hoegy F, Mislin GL, Schalk IJ (2014) Pyoverdine and pyochelin measurements. *Pseudomonas Methods Protoc* 1149:293–301.
- Kirienko NV, Cezairliyan BO, Ausubel FM, Powell JR (2014) *Pseudomonas aeruginosa* PA14 pathogenesis in *Caenorhabditis elegans*. In: Filloux A, Ramos J-L (eds) *Pseudomonas methods and protocols*. Springer, New York, pp 653–669
- Lindsey TL, Hagins JM, Sokol PA, Silo-Suh LA (2008) Virulence determinants from a cystic fibrosis isolate of *Pseudomonas aeruginosa* include isocitrate lyase. *Microbiology* 154:1616–1627. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/014506-0>.
- Matsuoka M, McFadden BA (1988) Isolation, hyperexpression, and sequencing of the *aceA* gene encoding isocitrate lyase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 170:4528–453. <https://doi.org/10.1128/jb.170.10.4528-4536.1988>.
- Murima P, Zimmermann M, Chopra T, Pojer F, Fonti G, Dal Peraro M, Alonso S, Sauer U, Pethe K, D. McKinney J (2016). A rheostat mechanism governs the bifurcation of carbon flux in mycobacteria. *Nat Commun* 7:12527. doi: 10.1038/ncomms12527.
- Park H-EH, Jung Y, Lee S-JV (2017) Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells* 40:90. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0017>.
- Porta-de-la-Riva M, Fontrodona L, Villanueva A, Cerón J (2012) Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *J vis Exp* 64:e4019
- Somerville GA, Proctor RA (2009) At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:233–248. <https://doi.org/10.1128/mubr.00005-09>.

- Thoma R, Hennig M, Sterner R, Kirschner K (2000) Structure and function of mutationally generated monomers of dimeric phosphoribosylanthranilate isomerase from *Thermotoga maritima*. *Structure* 8:265–276.
- Walden H, Bell GS, Russell RJ, Siebers B, Hensel R, Taylor GL (2001) Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase. *J Mol Biol* 306:745-757. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4433>
- Wittig I, Braun H-P, Schägger H (2006) Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1:418–428. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.62>.

