

00551

4

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

"Estudio de la regulación transcripcional de
rhlR en *Pseudomonas aeruginosa*"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
P R E S E N T A :
RAFAEL DIAZ MENDEZ

CUERNAVACA, MORELOS. MEX.

1999

27-4791

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A los Dres. Jose Luis Puente, Enrique Merino y Jesus Campos por su asesoría durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A los Dres. Alicia González, Gabriel Iturriaga, Lorenzo Segovia y Mario Soberón por la revisión y comentarios en la escritura de esta tesis.

A Elizabeth, Tania y Sudán por su apoyo y por todos los momentos que compartimos, por su motivación para seguir adelante y porque los quiero muchísimo.

A mis padres: Sara Méndez y Celedonio Díaz por su apoyo incondicional que siempre me han brindado.

A mi tía Camerina por haberme orientado cuando lo necesite, donde quiera que estes te la dedico.

A mis hermanos: Emmanuel, Jose Luis, Carmen, Karla, Toño, Alberto, Juana, Licha por el cariño y respeto que siempre nos hemos tenido.

A todos mis amigos, a los cuales menciono sin orden prioritario: Juan Estevez, Jesus Campos, Gerardo Medina, Renato Leon, Sergio Sarabia, Agustino, Gisela, Olivia, Clarita, Luis Gerardo, Naty, Tello, y pido una disculpa por los que me faltaron.

A mi jefa Gloria Soberón, por su apoyo y paciencia, y por todo ese tiempo utilizado en mi formación.

A todos mis compañeros de laboratorio por ese convivio diario que fue siempre muy ameno.

Este trabajo se realizó con apoyo de CONACYT.

INDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| 1. INTRODUCCION | 2 |
| 1.1 REGULACION TRANCRIPCIONAL MEDIANTE "QUORUM SENSING" | 2 |
| 1.2 LOS AUTOINDUCTORES EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS | 3 |
| 1.3 BIOSINTESIS DEL AUTOINDUCTOR | 4 |
| 1.4 EL GEN I | 6 |
| 1.5 EL GEN R | 7 |
| 1.6 ELEMENTOS REGULATORIOS EN CIS. | 12 |
| 1.7 ORGANIZACION ESTRUCTURAL DE LOS GENES REGULADORES | |
| TIPO LuxR | 13 |
| 1.8 REGULACION GENETICA GLOBAL DEL "QUORUM SENSING" EN <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . | 14 |
| 2. ANTECEDENTES | 16 |
| 3. OBJETIVOS | 17 |
| 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 18 |
| 5. METODOLOGIA | 19 |
| 5.1 CEPAS Y PLASMIDOS | 19 |
| 5.2 MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO | 20 |
| 5.3 ANTIBIOTICOS | 21 |
| 5.4 MANIPULACION DE DNA y RNA | 21 |
| 5.5 CRUZAS TRIPARENTALES | 22 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 5.5 | HIBRIDACION EN COLONIA | 22 |
| 5.6 | EXTRACCION DE RNA | 24 |
| 5.7 | ELECTROFORESIS DE RNA | 25 |
| 5.8 | PRIMER EXTENSION | 25 |
| 5.9 | PRECIPITACION DEL DNA MARCADO RADIATIVAMENTE | 26 |
| 5.10 | MEDICION DE ACTIVIDADES DE LA β -GALACTOSIDASA | 27 |
| 5.11 | PREPARACION DE CELULAS "COMPETENTES" | 30 |
| 5.12 | ELECTROPORACION | |
| 5.13 | OBTENCION DE DNA PLASMIDICO | 33 |
| 5.14 | EXTRACCION DE DNA POR GRADIENTE DE DENSIDAD EN CsCl | 36 |
| 6. | RESULTADOS Y DISCUSION | 38 |
| 6.1 | RELACION ENTRE LA FASE DE CRECIMIENTO Y LA EXPRESION TRANSCRIPCIONAL DE rhlR. | 38 |
| 6.2 | LOCALIZACION DE LOS INICIOS DE TRANSCRIPCION | 39 |
| 6.3 | IDENTIFICACION DE ELEMENTOS PROMOTORES EN CIS | 40 |
| 6.4 | ANALISIS DE LA TRANSCRIPCION DEL PROMOTOR TIPO sigma 54 | 42 |
| 6.5 | CONSTRUCCION DE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES QUE CONTIENEN LOS INICIOS DE TRANSCRIPCION 1,3 Y 4. | 47 |
| 6.6 | ANALISIS DE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES QUE CONTIENEN LOS INICIOS DE TRANSCRIPCION 1,3 Y 4 | 50 |
| 7. | CONCLUSIONES | 53 |
| 8. | REFERENCIAS | 55 |

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista gram-negativo, que causa serios problemas en pacientes con defectos generales o locales en su sistema inmune, es el principal factor de mortalidad en la fibrosis quística y es una de las mayores causas de infecciones en los hospitales.

La secreción de compuestos tóxicos (exotóxina A;piocianina) , de enzimas hidrolíticas (la elastasa, lasB ; proteasa LasA; proteasa alcalina Apr, fosfolipasa C), ramnolípidos y alginato estan asociados con su patogenicidad (1,2,3.). En *P. aeruginosa* se han descrito 2 vías principales para la regulación de la producción de algunos de éstos exocompuestos. Ambos circuitos son activados en condiciones de alta densidad celular, por los reguladores transcripcionales LasR y RhlR (4, 4a).

LasR y RhlR pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales tipo LuxR, esta familia está asociada al fenómeno de autoinducción, que es un mecanismo de control de la expresión genética dependiente de la densidad celular, el cual consiste en la activación de los reguladores transcripcionales a través de la interacción con N-acil homoserina lactonas (HSLs; autoinductores bacterianos) (5, 6).

Puesto que RhlR es un activador transcripcional que desempeña un papel primordial en la expresión de metabolitos relacionados con la virulenta de *P. aeruginosa* (13,14,15), el objetivo del presente trabajo es contribuir al esclarecimiento de la regulación de su expresión a nivel transcripcional.

INTRODUCCION

REGULACION TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE "QUORUM SENSING"

El "quorum sensing" es un mecanismo común de regulación transcripcional en bacterias. Fue descrito inicialmente por J. W. Hastings en la bacteria luminiscente, *Vibrio fischeri* (*Photobacterium fischeri*). El término "quorum sensing" fue descrito por primera vez por Clay Fuqua, Steve Winans y E. P. Greenberg en 1994 (16).

El sistema de "quorum sensing" es utilizado por un amplio número de bacterias gram-negativas para regular la transcripción de un grupo de genes por medio de la densidad celular(17).

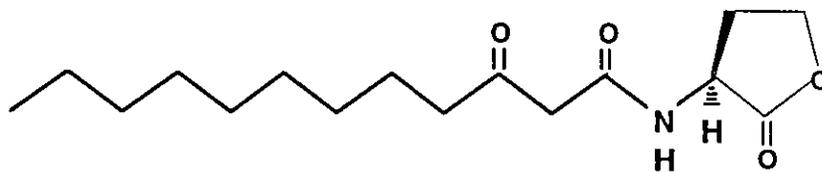
El control de la luminiscencia por medio de la densidad celular, en el simbiote marino *Vibrio fischeri*, es el sistema mejor estudiado a la fecha; es por esto que es considerado el sistema modelo para "quorum sensing", aunque cada uno de los sistemas presenta características únicas (17,18,19,20,21,22,23.).

En el "quorum sensing", la bacteria realizó un censo de su población. Cuando se alcanza una suficiente densidad celular, la bacteria responde produciendo ciertos metabolitos. Una molécula de señalización intercelular (autoinductor) se produce en las células bacterianas, ésta se difunde al medio, y cuando alcanza una concentración crítica, ocurre la activación genética.

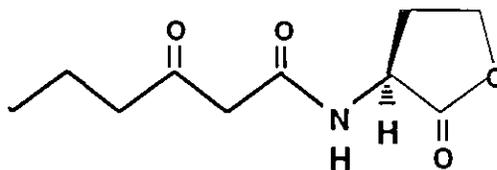
Existen dos genes esenciales para la regulación mediada por el sistema "quorum sensing" : el gen I y el gen R. El gen I codifica para una enzima autoinductor sintasa que dirige la síntesis de N-acil homoserin lactona (HSL, autoinductor) . El gene R codifica para un activador transcripcional, que es activado por el autoinductor (N-acil HSL).

LOS AUTOINDUCTORES EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

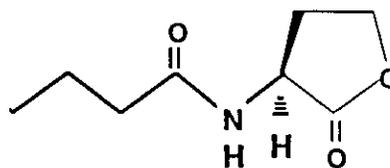
Los autoinductores típicos en bacterias gram negativas, salvo algunas excepciones, poseen un anillo de homoserina lactona (HSL), y un ácido graso. La diferencia entre los autoinductores está en el tamaño del ácido graso y las sustituciones que éste presenta (24) (Figura 1).



N-3-oxododecanoil homoserina lactona (PAI-1) (OdDHL)



N-3-oxohexanoil homoserina lactona (VAI-1) (OHHL)



N-butanoil homoserina lactona (PAI-2) (BHL)

Figura 1. - Muestra las estructuras de algunas moléculas autoinductoras: OdHL presente en *P. aeruginosa*; OHHL presente en *E. agglomerans*, *E. carotovora*, *E. stewartii*, *N. europaea*, *O. proteus*, *V. fischeri*, *Y. enterocola* y *Y. pseudotuberculosis*; BHL presente en *Aeromonas hydrophila*, *A. salmonicida*, *P. aeruginosa* y *S. liquefaciens*.

El descubrimiento de que la molécula autoinductora (N-(3-oxohexanoil)-L-homoserin lactona) (OHHL., VAI-I) en el sistema de luminiscencia de *Photobacterium fischeri*, es capaz de regular la conjugación en *Agrobacterium tumefaciens*, además del metabolismo secundario y la virulencia en el patógeno de plantas *Erwinia carotovora*, ha incrementado el interés de acerca del papel que desempeñan los HSLs en la expresión genética bacteriana.

Un amplio número (aun creciente) de bacterias sintetizan HSLs como parte de un sistema de comunicación intercelular (24a) (Tabla 1), que facilita la inducción de regulones genéticos. Esta inducción genética se lleva a cabo cuando la población bacteriana alcanza una densidad celular significativa. La dependencia de la densidad celular es producto de la acumulación de la molécula señal, que ha alcanzado una concentración crítica.

BIOSINTESIS DEL AUTOINDUCTOR

Ya que el "quorum sensing", es un factor importante en la expresión de genes de virulencia en patógenos de plantas y animales (6,13,17,25), resulta importante dilucidar el mecanismo de la biosíntesis de las moléculas autoinductoras (acil-HSLs).

Los cultivos en fase exponencial de *V. fischeri* y *V. harvery* expresan débilmente los genes *lux* durante la fase temprana de crecimiento exponencial, mientras que cuando entran a la fase tardía de crecimiento exponencial, la expresión del operon *lux* se activa fuertemente (26,27).

Los primeros indicios de la presencia del autoinductor, fueron observados cuando en un medio libre de células, y recuperado de un cultivo crecido hasta fase estacionaria, fué capaz de activar la luminiscencia de cultivos en un estadio

| ORGANISMO | FENOTIPO | SISTEMA QUORUM SENSING | | | Número de acceso GenBank |
|--|--|---------------------------|------------------------------|----------------------------|--|
| | | Gen I | Gen R | Autoinductor | |
| <i>Aeromonas hydrophila</i> | Proteasas extracelulares | AhyI | AhyR | BHL, HHL | X89469 |
| <i>Aeromonas salmonicida</i> | Proteasas extracelulares? | AsaI | AsaR | BHL, HHL | U65741 |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | Conjugación | TraI | TraR | OOHL | L17024, L22207 |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | Antibióticos, exoenzimas, cianuro, violaceína | CviI | CviR | HHL | |
| <i>Enterobacter agglomerans</i> | ? | EaqI | ? | OHHL | X74300 |
| <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> | antibiótico Exoenzimas | CarI (ExpI) (ExpI) | CarR ? | OHHL | U17224, X72891, X74299, X80475 |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i> | ? | ExpI EchI | ExpR EchI | ? | X96440 U45854 |
| <i>Erwinia stewartii</i> | Exopolysacárido | EsaI | EsaR | OHHL | L32183, L32184 |
| <i>Escherichia coli</i> | División celular | ? | SdIA | ? | X03691 |
| <i>Nitrosomonas europaea</i> | Salida de la fase lag | ? | ? | OHHL | |
| <i>Obesumbacterium proteus</i> | ? | OprI | OprR | OHHL | |
| <i>Vibrio (Photobacterium) fischeri</i> | Bioluminiscencia | LuxI AinS | LuxR AinR | OHHL, HHL OHL | M19039, M96844, M25752, L37404 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Proteasa alcalina, elastasa, exotoxina A, exoenzima S, neuraminidasa, hemolisina. Quitinasa, elastasa, cianuro, piocianina, ramnolípido, lectinas, actividad estafilocítica, hemolisina, proteasa alcalina, RpsS ? | LasI RhII ? | LasR RhIR PhzR | OXDHL BHL ? | M59425, SwissProt P33883 L08962, U11811, U15644 |
| <i>Pseudomonas aureofaciens</i> | Antibiótico fenazina | PhzI | PhzR | ? | L32729, L33724 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Antibiótico fenazina | PhzI | PhzR | ? | L48616 |
| <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tahaci</i> | ? | PsyI | PsyR | ? | U39802 |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> | ? | SolI | SolR | ? | AF021840 |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> | Nodulación, Bacteriocina pequeña. | ? | RhIR | ? | M98835 |
| <i>Rhodobacter sphaeroides</i> | Community escape | CerI | CerR | ? | AF016298 |
| <i>Serratia liquifaciens</i> | Dwarming, fosfolipasa | SwrI | ? | BHL | U22823 |
| <i>Vibrio anguillarum</i> | ? | VauI | VauR | OHHL | U69677 |
| <i>Vibrio Harveyi</i> | Bioluminiscencia, metabolismo del polihidroxibutirato | LuxLM | LuxN | HBHL | L13940 |
| <i>Xenorhabdus nematophilus</i> | Virulencia, lipasa bacteriana | ? | ? | HBHL o un homólogo similar | |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | ? | YenI | YenR | OHHL, HHL | X76082 |
| <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> | ? | YepI | YepR | OHHL, HHL | |
| <i>Yersinia ruckeri</i> | ? | YukI | YukR | ? | |

Tabla 3.-Sistemas "quorum sensing" en algunas bacterias gram-negativas.

temprano de crecimiento exponencial. La sustancia capaz de ocasionar este fenómeno recibió el nombre de autoinductor (26,28). Eberhard et al. (29), posteriormente purificó el autoinductor de *V. fischeri*, y encontró que el autoinductor era una N(3-oxohexanoil) homoserina lactona (VAI-I) (Figura 1)., y demostró que ésta molécula se difunde libremente a través de la membrana bacteriana (30). Engebrecht et al. mas tarde demostró que cepas de *E. coli* que tenían clonada una copia de *luxI*, fueron capaces de producir el autoinductor específico de *V. fischeri* (VAI-I) (31). A su vez este resultado sugería que el sustrato para la enzima LuxI, deberían ser metabolitos comunes. De igual forma, otros homólogos de *luxI*, clonados en cepas de *E.coli*, son capaces de producir su autoinductor específico., indicando que cada una de las proteínas tipo-LuxI determinan el autoinductor específico a producir.

Experimentos recientes, indican que las proteínas tipo LuxI son autoinductor sintetasas que utilizan como sustratos acil-ACPs y S-adenosil metionina (SAM) (32,33,34,35,36,37). Los datos disponibles a la fecha permiten plantear un esquema de la biosíntesis del autoinductor (figura 2).

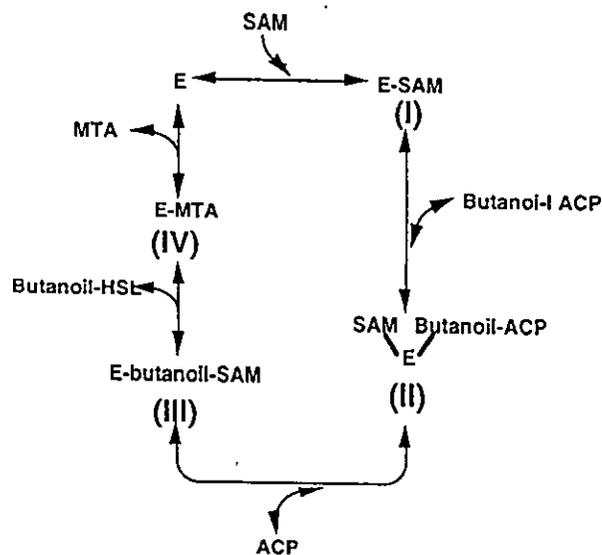


Figura 2.- Mecanismo de reacción enzimática propuesto para la síntesis del autoinductor por RhII. El orden secuencial de sustratos y productos se muestra entre parentesis. Esta es una reacción ordenada en la cual los sustratos se unen en un orden definido y los productos se liberan en un orden definido. E, enzima; ACP, proteína acarreadora de grupos acilo; SAM, S-adenosil metionina; MTA, 5-metil tioadenosina; Butanoil-HSL, Butanoil homoserina lactona.5

Este modelo contempla como primer paso, el ataque nucleofílico de la posición C1 del conjugado acil-ACP, por medio del nitrogeno amino de SAM, generando una union tipo amida. La lactonización subsecuente o sucesiva a la formación del grupo amida, da como resultado la formación de un anillo, la liberación de la acil-HSL, y la formación del producto lateral 5-metil tioadenosina (MTA).

Aunque el mecanismo para la biósisntesis de los autoinductores (HSLs), parece haber sido dilucidado, aun se desconocen algunos pasos catalíticos , por ejemplo:

Las aciltransferasas que interaccionan con sustratos unidos a ACP, casi siempre forman uniones covantes transitorias (uniones ester o tiester) entre las cadenas acilo y los residuos de cisteína o serina . La existencia de residuos conservados de cisteína o serina (Cys68 y Ser104 en LuxI) sugiere que las acil HSL sintasas podrían tener un mecanismo de acilación transitoria (17,32,38), sin embargo, el análisis de mutaciones dirigidas en las proteínas LuxI, TraI y RhlI, revelan que la cisteína conservada (asi como las no conservadas en cada proteína) es dispensable para la actividad de acil HSL sintasa (39,36). Por otro lado, la mutación en la serina conservada de TraI, abate por completo su actividad de acil HSL sintasa, sin embargo este residuo no es esencial en las proteínas LuxI y RhlI. Aunque éstos resultados demuestran que la acilación transitoria no ocurre en estos residuos, es posible que la union covalente ocurra en otro residuo de la proteína.

EL GEN I

Los homólogos de LuxI muestran una similitud en secuencia de entre 28 a 35 % (excepto para los miembros de mismo género (figura 3)).

```

1  MTIMIKKSDFLAIPSEEYKGLSLFVQVSKQRLKLDLVVNNLESDEYGN-SNAEYIYACD--DTENVSGCWLLPPTGD LUXI
1  MLILTVSPDQYQHNSYLKQMHRLRAEVEGNRLKVDVAIEDGGERDQYUELS-PTYILATF--GGQRVVGCAPLLAPSGP TRAI
1  MIVQIGRREEF--DKKLLGEMHKLPAQVYKERRKGDVSVIDEMEIDGYALS-PYYMLIQEDTPEAQVFGCWILDTTGP LASI
1  -MIELLESLEGLSAAMIAELGRYRHOVYIEKLGSDVVSSTSRVDRQEFQFDHPOTRYIVA-MGRQIGCGCAPLLPTTDA RHLI
1  --MHMEHTLNQMSDELKMLGRFPHQFVEKLGWRPAPHPQAGCEWQDYDTEHARYLLAFNEDRAIVGCAPLIPTTFP PHZI
1  -MLEIFDVSYTLSEKKSEELFTLRKETPKDRLNVAVKCINGMEFDQYED-DNATYLFGEV---GDQVICSSELIETKYE EXPI
1  -MLEIFDVNHTLLSETKSEELFTLRKETPKDRLNVAVQCTDGMFDQYGN-NNTTYLFGIK---DNTVICSLFPIETKYE HSLI
1  -MLEIFDVNHTLLSETKSEELFTLRKETPKDRLNVAVQCTDGMFDQYGN-NNTTYLFGIK---DNTVICSLFPIETKYE CARI
1  -MLEIFDVSYEELQTRSEELYKLRKKTFSDRLCGEVICSQGMESDEPLG-PGTRYILGIC---EGQLVCSVFTSLDRP ESAI
1  -MLEIFDVSYNDLTERRESDELYKLRKITPKDRLDVAVNCNDMEFDEFDN-SGTRYMLGIY---DNQLVCSVFTDLRLR EAGI
1  -MLKLFNVFNFNMPERKLEIFSLRKITPKDRLDKVTICIDGKESDQYED-ENTNYILGTI---DDTIVCSVFTDMKYE YENI
1  -MIELFDVDYNLLPDNRSKELFSLRKTPKDRLDLVNCCENNEFDEYGN-RHATYIFGTY---QNHVICSLFPIETKYE SWRI

78  YMLKSVPELLGQOSAPKDPNIVELSLFAVGKN--SSKINNSASEITMKLFEAIYKHAVSQGITTEYVTVSTAIERFLKH LUXI
78  TMLERTFPOLLATGSLSATAMIEFSFCVDITLPTGRACRQLHLATLTMFAGLIEWSMANGYDEIVTATDLRFERILKR TRAI
78  YMLKTFPELLHGKEAPCSPHIWELSRFAINS---GQKGLSFGSDCTLEAMRALARYSLQNDIQTLVTVTGVEKMMIR LASI
79  YLLKEVFAYL-CSETPPSDPSVWELSPYAASAA-----DDPQLAMKIFWSSLQCAWYLGASVVAVTTTAMERYFVR RHLI
79  NLEGVEGHT-CAGAPPKHPAIWEMTPETTR-----EPQLAMPLFWRSLKTASLAGADAIIVGNSTMERYYKI PHZI
76  NMITGTFP-PYFEKIDIPEGKYIESSRFVVDKARSKTILGNSYPVSTM--FFLATVNYSKSKGYDGVYTIIVSHPMLTILKR EXPI
76  NMITGTFP-PYFKEINIPEGNYLESSRFVVDKSRADILGNEYPISSM-LFLSMINYSRDKGYDGIYTIIVSHPMLTILKR HSLI
76  NMITGTFP-PYFKEINIPEGNYLESSRFVVDKSRADILGNEYPISSM-LFLSMINYSKDKGYDGIYTIIVSHPMLTILKR CARI
76  NMITHTF-QHCFSDVTLPAYG-TESSRFVVDKARARALLGEHYPI SQV-LFLAMVNWANNAYGNIYTIIVSRMLKILTR ESAI
76  NMITHTF-QHLFGDVKLPEGDYIDSSRFVVDKNRKALLGSRYPI SYV-LFLSMINYARHHGHTGIYTIIVSRAMLTIAKR EAGI
76  TMITGTFP-APYFSDVSLPIDGFISSRFVVEKALARDMVGNNSSLSTI-LFLAMVNYARDRGHGKGIILTVSRGMFILLKR YENI
76  NMISDGVFDTYFNDIKLPDGNVYASPLFIDKARIQALQLHQAPISAM-LFLSMINYARNCGYEGIYAIIVSHPMRIIFOR SWRI

156  IKVPECHRIGD-----KEIHVLGD--TKSVVLSMPINEQFKKAVLN LUXI
158  AGWPMTRLGEPVAIGNTVAVAGHLPADRKSFERVCCPPGYRSIIADDNGRPLRSAA TRAI
155  AGLDVSREFPHLKIGIERAVALRIELNAXTQIAL----YGGVLVEQRLAVS LASI
150  NGVILQRLGPPQKVKGETLVAISFPAYQERGLEMLLRYHPEWLQGVPLSMAV RHLI
147  NGVHYERLGPVTVHQEKILAIKLSAHRHRSVAVP--SAFMSDTLLRETA PHZI
154  SGWIKISIVEQGMSEKHERVYLLFLPVDNESQDVLVRRINHNQEFVESKLRWPLSFEPMTPEVG EXPI
154  SGWIRVVEQGLSEKEERVYLVFLPVDDENQEALARRINRSGTFMSNELKQWPLKGPAAIAQA HSLI
154  SGWIRVVEQGLSEKEERVYLVFLPVDDENQEALARRINRSGTFMSNELKQWPLRVPAAIAQA CARI
153  SGWQIKVIEKAFITKERYLLTLPAGQDDKQQLGGDVSRGTGCPPVAVTWPPLTLPV ESAI
154  SGWEIEVIEKGFVSENEPIYLLRPLIDCHNQHLLAKRIRDQSESNIAALCQCPMSLTVTPEQV EAGI
154  SGWNTVNLQGESEKNEVIYLLHLGIDNDSQQQLINKILRVHQVEPKTLETWPIIVPGIYK YENI
155  SGWHISVVKTGCSKKNKIYLIYMPIDDANRNRLARINQHATKMG SWRI

```

Figura 3.- (Tomado de Fuqua et al 1996) Alineamiento multiple de secuencias de algunos miembros de la familia LuxI. El sombreado tenue indica una similitud arriba de 50% entre residuos aminoácidos. Las sombras oscuras indican la presencia de residuos aminoácidos identicos en todas las proteínas alineadas.

La secuencia nucleotídica del gen rhlI de *P. aeruginosa*, permite predecir una proteína de 196 aminoácidos con un peso de 22,202 Daltones, una carga de -3.96 a pH 7.0 y un punto isoeléctrico de 5.442 ().

EL GEN R

Aunque existen regiones muy conservadas, los niveles de similitud en secuencia son frecuentemente muy bajos, entre 18 y 25% entre los miembros de la familia LuxR (17) (Figura 4).

```

1  -MKNINADDTYRIINKIKACRAYDINQCLSDMTKMVHCEYY--LTLAIYPHSMVKSDISILDNYEKKRQYDDANLIK LUXR
1  ----MQHWLDKLTDLAAIEGDECILKTGLADIADHFGFTGYAYLHI-----QHRHITAVTNYHROQSTFDKKEFEA TRAR
1  -----MALVDGFLELERSGKLEWSAILQKMASDLGFSKILFGLLPKDSQDYENAFIVGNYPAAAREHEDRAGYAR LASR
1  ---MRNDGGFLLWWDGLRSEMQPIHDSQGVFAVLEKEVRRLLGFDDYAYGVRHTIPFTRPKTEVHGTYPKAWLERHOMONYGA RHLR
1  --MELGQQLGWDAYFYISIPARTMDMQEFTAVALRALRELRFDFFRYGMCSVTPFMRPRTYMYGNYPEDVQVRYQAANYAV PHZR
1  -----MSQLFYNNETISRIKSOQFDMALSHYGDIKYAYMVLNKKKPT-----EILISNHHEDEIRETOANNYQH EXPR
1  -----MDHEIHSFIKRKLKGVGDVWFYSYFMMSKNSTS-----QPYIISNYPEAMKKEIKKEMFL CARR
1  -----MFSFFLENQTTITDTLQTYIQRKLSPLGSPDYAYTVVSKKNPS-----NVLIISSEDEWIRLRANNFQL ESAR
1  -----MIIDYFDNESINEDIKNYIQRRIKTYGDLCSYLVMNKKTP-----HPTIISNYELDVKKKKNYSYHL YENR
1  MKEESSAVSNLVDFPLSESASAKSKDDVLLFGKISQYFGFSYFAISGIPSPIERIDSYFVLGNWVGVGDFDRRENHYVH RHIR
1  --MQDKDFFSWRRTMLLRFORMETAEEVYHEIELQAQOLEYDYSLCVRHPVFPTRPKVAFYTNYPEAVSYQAKNFLA SDIA
1  ---MKQDQLEYLEHFTSVTDGDRLAELIGRFTLGMGYDY---RFALIEPMSMQRPKVVLNQCEDSSVQANTANHMLA AHYR

78  YDFIYDYSNSNIISPINNI FENNA--VNKKS PNVIKEAKTSGLITFSSFPPIHTANNGFGMLSFAHSEKDNYSIDSLFLHAC LUXR
69  LQFVVKRARSRKHIFTHSG-EHERPTLSKDERAFYDHASDFGIRSSITIPIKTANGFMSMPTMA---SDKPKVIDLDREID TRAR
72  VDFVSHCTQSVLPIEFW---EPSIYQTRKQHEFFEEASAAGLVYSLTmplhGARGELGALSLSVEAENRAEANRFIESV LASR
80  VDFAILNGLRSSEMVMW---SDSLF--DQSRMLWNEARDWGLCVATLPIRAPNN-LLSV-LSVARDQONISSFEFEI RHLR
79  IDFTYKHSKVSSSIPILA---SNELF--RGCPLWSEANDSNLRHWLAQPSFNTQ-GRVGV-LSLARKDNPI SLQEFEAL PHZR
66  IDPVI AALNKITPFPHD--EDLLVSTQLKMSKIFNLSREHNTINBYTFVLHDHNSNVLWLSIMIDESNVSNIDDDIESN EXPR
56  SOPIIVASLARITPFPHD--DNDIVTLRAKNQDVFISVQHDISSYTFVLHDHNNVATLSIANHLEDA-NFEKCMKNH CARR
66  TDFVILTAFKRTSPFAWD--ENITLMSDLRFTKIFSLSKQYINVGFTYVLDHDMNLLALLSVI IKGNDQTALEQR LAE ESAR
66  IDPVI LTAKDVAFFAWD--DNSVINKSTDSAVFKLAREYNIVNGYTFVLHDNSNMMATLNI SNGSDDSI SFDERIEIN YENR
81  ADPIVHLSKTCDAHFVWSEALRDQKL-DRQSRRVMDAREFKLIDGFSVPLHTAAGFQSIVSFG---AEKVELSTCDRS RHIR
79  IDPVLNPFNSQGHLMW---NDDL F--SEAQPLWEAARAHLRRGVHVSFNAAQTGALGF-LSFSRCSRREI PLSDEL SDIA
75  DDFIQLARKQTLPIYWRNRLDERARFLQEGSLDVMGLAAEFLRNISFPLHGAAGENGILSFITAEARASSDLLESSPI AHYR

156 MN-IPLIVPSLVDNYRKI-----NIANNKSNNDLTKRKECLAWACEKSSWDISKILGCSERTVTFHILTNAQMKL LUXR
145 AVAAATIGQIHARISEL-----RTTPTAEDAACVDPKATYLRWIAVSKTMEIADVEGVKYNVVRVRLRERMKRF TRAR
148 LPTLWMLKDYALQSGAGI-----AFEHPV-SKPVVLTSPREKVLQWCAISKTWEISVICNCSEANVNFHMGNI RRKF LASR
152 RLRLRCMIELLTQKLTDL-----EHPM-LMSNPVCLSHRREILOWTADCKSSGELAILLSISESTVNFHKNIQKPF RHLR
151 KVVTKAFAAAVHEKISEL-----ESDVRVFN TDVEFGRECDVLRWTADEKTSSEIGVMGVCTDTVNYHHRNIQRKI PHZR
144 KDKLQMTLMTIHAETISLYREMIRNKEDERSN-DKDI FSORENEILYWASMKTYQELALLDIKTGTVKFHIGNVVVKL EXPR
133 ENDLQMLLVNVHEKUMA-YQRAINDQDNPPDNSRNALLSPRETEVLPLVSSRTYKEVSRI LIGISEVTVKFHINN SVRKL CARR
144 QGTMQMLLIDENEQMYRLAGTEGERAPALNQSADKTI FSSRENEVLYWASMKTYAEIAATGIVSVTVKFHINKVNVVKL ESAR
144 KEKIQMLLIITHEKMLGLYQSNSDKNENRNTQIERDIFSPRENEILYWASVKTYAEISILGKRSTVKFHIGNVVVKL YENR
156 ALYLMAYAHSLLRAGIG-----NDASRKIQALPMTTTREREIHWCAAKTAIEIATILGRSHRTIQNVILNIQRKL RHIR
152 QLKMQLLVRESLMLMRL-----NDEI-VMTPEMNFSKRKEILRWTAEKTSAEIAMI LSI SENTVNFHQNMOKKI SDIA
155 LSWMSNYIFEAAIRIVRV-----SLREDDPQEALTDRETECLFWASEKTSGEIACILGITERTVNYHLNQVTRKT AHYR

226 NTTNRQOSISKAILTGATDCPYFKN LUXR
217 DVRSKAHLTALAIRKLI TRAR
220 GVTSRRAAIMAVNLGLITL LASR
224 DAPNKTAAAYAAALGLI RHLR
224 GASNRVQASRYAVAMGY PHZR
223 GVLNAKHAI RLGIELQIRPVQS EXPR
212 DVINSRHAIKALELNLPHSPCEPVVMKHM DAR CARR
224 GVSNAQAIRLGVELDLIRPAASAAR ESAR
224 GVLNAKHAI RLGIELKLIKPI YENR
229 NVVNTPQMI AESFRLRIIR RHIR
224 NAPNKTQVACYAAATGLI SDIA
226 GSMNRYQATAKGVSSGILLPNLEQVVVTFPKLMQ AHYR

```

Figura 4.- (Tomado de Fuqua et al 1996) Alineamiento multiple de secuencias de algunos miembros de la familia LuxI. El sombreado tenue indica una similitud arriba de 50% entre residuos aminoácidos. Las sombras oscuras indican la presencia de residuos aminoácidos identicos en todas las proteínas alineadas.

Los análisis genéticos que la proteína LuxR, demostraron que esta compuesta de dos dominios funcionales principales (40,41): el dominio N-terminal (entre residuos 20 y 120), el cual posee el sitio de unión para el autoinductor (entre residuos 79-120) y el dominio regulador de la transcripción localizado hacia el extremo C-terminal (entre residuos 160 y 250) (Figura5).

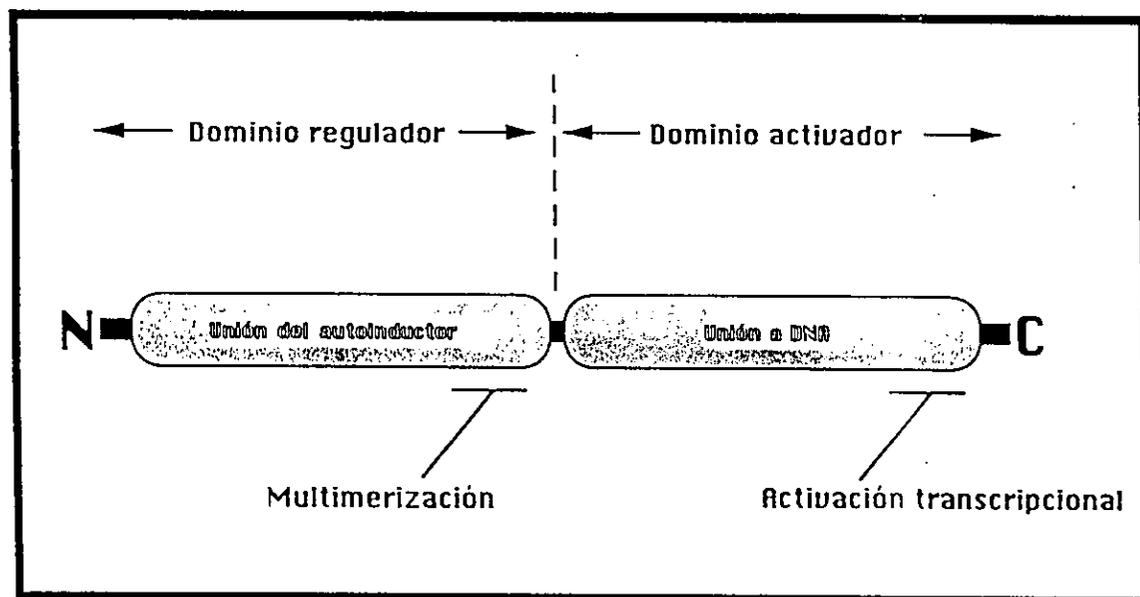


Figura 5. -La proteína LuxR consta de dos dominios: El dominio regulador (N-terminal) y el dominio activador (C-terminal). El dominio activador se extiende del residuo 160 al residuo carboxilo terminal 250, y contiene una región de pegado a DNA tipo hélice-vuelta-hélice. Este dominio activador interacciona con el complejo de inicio de transcripción. La región comprendida entre los residuos 230 y 250 al parecer se requiere para la activación transcripcional, pero no se requiere para la unión a DNA. El dominio regulatorio se extiende hasta el residuo 160; una región de este dominio (residuos 79 a 127) esta relacionada con unión del autoinductor, y otra región comprendida entre los residuos 120 y 160 se requiere para la multimerización. En ausencia del autoinductor el dominio regulatorio interfiere con la actividad del dominio activador.

El dominio regulador de esta región contiene un motivo de unión a DNA tipo helice-vuelta-helice (residuos 190-210). El tercio de la

proteína hacia el extremo carboxilo terminal, es homólogo a los dominios de unión a DNA de un extenso grupo de reguladores transcripcionales (superfamilia LuxR). Esta región contiene un supuesto motivo helice-vuelta-helice de 19 aminoácidos, el cual debe estar involucrado a la unión del promotor blanco. La unión específica de esta región, se demostró en la misma proteína luxR, así como en otros miembros de la superfamilia (algunos ejemplos: fixJ(42), NarL (43), Narp(44) y UhpB(45).

El mecanismo propuesto para la activación transcripcional de esta superfamilia de proteínas, es que el dominio N-terminal actúa negativamente, impidiendo la interacción entre el dominio C-terminal y su sitio de unión en el DNA(46). Esta inhibición puede ser liberada por la acción de un ligando (el autoinductor en el caso de luxR, o un grupo fosforilo en las proteínas reguladoras de los dos componentes, como fixJ). La realización del modelo se basa en estudios llevados a cabo utilizando deleciones de la proteína LuxR, los cuales aportan los siguientes datos:

- cuando se deletó la región N-terminal, las proteínas resultantes activaron la transcripción constitutivamente.
- con la deleción del supuesto motivo de unión a DNA, se abolió completamente la activación transcripcional.'
- se demostró que una de estas proteínas truncadas se unen a DNA en ausencia de su autoinductor (VAI-I).
- cuando se deletaron alrededor de 40 aminoácidos en el extremo carboxilo (del aminoácido 211 al 250), la proteína resultante, conservó su capacidad de unirse a la zona regulatoria lux del DNA , pero fue incapaz de activar la transcripción del operon lux.

Los resultados anteriores sugieren que la región N-terminal de las

proteínas tipo LuxR, inhiben la unión de la región C-terminal-DNA blanco , y que el autoinductor libera esta inhibición. Así como que la región entre los residuos 211 y 250 de la proteína LuxR, podría requerirse para la activación transcripcional subsecuentemente a la unión de ésta al DNA.

Estudios recientes sugieren que EsaR, ExpR y YenR actúan más como represores que como activadores de sus genes blanco. Ya que la expresión de los genes reprimidos por EsaR y ExpR, es incrementada por sus autoinductores, se sugiere que éstos compuestos inhiben el efecto represivo de éstas proteínas. Si se asume que la unión de éstas proteínas a su sitio blanco en el DNA causa represión, de este modo, el autoinductor podría reducir la afinidad de unión al DNA, y por lo tanto liberar la inhibición.

Aunque aún no ha sido posible purificar la proteína LuxR en su forma activa, se tiene evidencia bioquímica de que ésta se une al DNA, utilizando un fragmento C-terminal que es constitutivamente activo *in vivo*. No se observó la unión específica a la secuencia del promotor *lux*, cuando se utilizó como ligando la región C-terminal de LuxR o la RNA polimerasa por separado, sino que hasta que ambos, LuxR y RNA polimerasa fueron añadidos juntos. Este análisis sugiere que LuxR y RNA polimerasa podrían tener un efecto cooperativo de unión al promotor *lux*.

Se tiene evidencia de que el autoinductor VAI-I interacciona directamente con LuxR (41). Algunos análisis de mutaciones en la proteína LuxR, sugieren que la región responsable de la interacción con el autoinductor, se localiza en el extremo N-terminal. Se pudo delimitar una zona localizada entre los residuos 79 y 127, en la que las proteínas con mutaciones en ésta región, requieren de niveles más altos de autoinductor para su activación,

que la proteína LuxR nativa. La región en la cual se localizaron éstas mutaciones muestran un alto grado de conservación entre la proteína LuxR y sus homólogos (50% de identidad).

La observación de que LuxR reconoce un amplio rango de N-ácil homoserin lactonas, cuando es expresada en *E.coli*, ha generado la hipótesis de que la proteína LuxR podría no interaccionar directamente con el autoinductor, sino a través de otra proteína que reconociera al autoinductor. Sin embargo, los estudios genéticos y de receptor-ligando, mencionados anteriormente, apoyan más una interacción directa entre la proteína luxR y el autoinductor.

Análisis de cepas de *E. coli* que contenían alelos de luxR silvestre y el mutado, sugieren que LuxR funciona como homomultímero y que la región requerida para la multimerización, se encuentra entre los residuos 116 y 161 (47). La región del DNA (caja lux) donde se une la proteína luxR exhibe una simetría dial (48,,50,) al igual que otros supuestos sitios de unión de homólogos de LuxR (49,51,52,53,54,55), esta característica sugiere que las proteínas luxR posiblemente se unen a la cajas lux en forma de dímeros.

ELEMENTOS REGULATORIOS EN CIS.

La caja lux es una región invertida repetida de 20 nucleótidos, localizada a 44 nucleótidos arriba del sitio de inicio de transcripción del operón lux (figura 6) (16,55). Esta caja es indispensable para la activación del operon de luminiscencia, y muy probablemente es el sitio de unión de la proteína LuxR. De manera semejante, en la región promotora de los genes tra, las cajas tipo lux (cajas tra, 18pb) se localizan arriba de al menos tres genes regulados por TraR, y la interrupción de éstos elementos

anula la activación transcripcional por TraR (54). Las cajas tipo *lux* presentes en los promotores regulados via LasR (cajas *las*), así como en otros, invariablemente sobrelapan por un nucleótido, el elemento -35 de la región de pegado de sigma70 (53,56,54). Las cajas *lux* y las cajas *las*, son suficientemente similares para que LuxR pueda activar la transcripción del promotor *lasB* en presencia de VAI-I, y viceversa, LasR puede activar la transcripción del promotor *lux*, en presencia de PAI-I (56).

Por otro lado, otros promotores regulados por TraR y LasR carecen de cajas tipo *lux*. Tal es el caso del promotor de *lasI* que al parecer carece de regiones consenso tipo caja *lux* (35), y sin embargo es inducible por LuxR. La proteína TraR activa la expresión del gen *traR*, en un promotor que no tiene similitud discernible a la caja *tra* (57). El promotor *traM* de *A. tumefaciens* no tiene una caja *tra* común, sino que ésta parece estar dividida en dos mitades (58,59).

ORGANIZACION ESTRUCTURAL DE LOS GENES REGULADORES TIPO LuxR

Los sistemas de regulación tipo LuxR-LuxI comunmente se encuentran adyacentes. En *Photobacterium fisheri*, *luxR* y *luxI* se transcriben divergentemente (60). En contraste algunos se transcriben convergentemente, tal es el caso de *expR* y *expI*, *phzR* y *phzI*, *yenR* y *yenI*, y los genes *esaR* y *esaI* (51,61,62,63). En algunos casos, genes R-I que se transcriben en la misma dirección sobrelapan en el extremo 3', tal es el caso de los sistemas *lasR-lasI* y *rhlR-rhlI* presentes en *Pseudomonas aeruginosa*, aunque estos no son expresados como un solo operón (4a,64,13). En contraste a los ejemplos anteriores, los genes *traR* y *traI* en *A. tumefaciens*, están separados por 60 kb en los plasmidos Tipo-octopina y por 30 kb en plasmidos Ti tipo nopalina(65,66,67).

REGULACION GENETICA GLOBAL DEL "QUORUM SENSING" EN *P. aeruginosa*

En *Pseudomonas aeruginosa*, LasR junto con su autoinductor N-3-oxododecanoil HL (sintetizado por la enzima LasI) regulan la expresión de *lasB*, que codifica para una elastasa involucrada en virulencia (68,69). LasR también afecta la expresión del gen *lasA* (una segunda elastasa), la proteasa alcalina (*apr*) y también la actividad de la exotoxina A (ETA) (70,71). Aunque aún existe controversia respecto a la jerarquía regulatoria entre los sistemas LasR y RhlR, existen datos que sugieren que LasR controla la expresión de *rhlR* (72,73). RhlR es requerido para la regulación de ramnolípidos (*rhlAB*) y requiere para su actividad del autoinductor N-butanoil HL (4a,64). Mutantes de *P. aeruginosa*, en el gen *rhlI*, son incapaces de producir metabolitos secundarios tales como piocianina y cianuro, también manifiestan defectos en la producción de elastasa (4a,74). Sin embargo, la expresión de los genes *xcp*, que codifican para proteínas de la ruta general de secreción, son activadas por ambos sistemas, RhlR y LasR. Finalmente existe un reporte de que el N-3-oxohexanoil HL exógeno, promueve la síntesis del antibiótico fenazina, aunque el mecanismo por el cual se sintetiza aun no es claro (75).

Al parecer, en *P. aeruginosa* existe una amplia red regulatoria controlada por ambos sistemas RhlR y LasR. En un reporte reciente se encontró que se requiere de RhlR y N-butilil HL (su autoinductor), para la expresión del factor sigma de fase estacionaria (RpoS) (72,76). En *E. coli* existe un amplia variedad de genes que forman parte del regulon *rpoS* (76,77)., y podríamos asumir que en *P. aeruginosa*, el gen *rpoS* también tiene una influencia regulatoria muy amplia. Las alteraciones en funciones

específicas en el fondo de una mutante regulatoria *las* o *rhl*, podrían reflejar directamente el control por medio de la cascada quorum-sensing o el control indirecto de RpoS.

Aunque la densidad de población ("quorum sensing") y el estatus nutricional de la célula, son fenómenos independientes, éstos se encuentran relacionados., es por ello que la bacteria ha desarrollado una serie de mecanismos para integrar ambas respuestas. Un ejemplo de esta interacción la constituye el desarrollo del biofilm, donde la expresión de LasI es esencial para su formación (78).

Estudios recientes sugieren que la expresión transcripcional de *lasR* se encuentra regulada por Vfr (Factor regulador de la virulencia, un homólogo de Crp en *E. coli.*), en respuesta a una señal aún no identificada (79,80). Por otro lado se ha propuesto que *rhlR* y *lasR* se encuentran bajo el control de GacA (un regulador responsivo del sistema de los dos componentes, miembro de la superfamilia LuxR/FixJ) (81). GacA y su sensor cinasa LemA, regulan la expresión de una amplia variedad de genes de virulencia, en respuesta de una señal aun no identificada (82). Por otro lado, es importante señalar que en la mutante *gacA*⁻, no se encontraron cambios significativos en la expresión oxohexanoil HSL (autoinductor de LasR), mientras que la expresión de butanoil HSL (autoinductor de RhlR) se abatio en un 90% en la fase de crecimiento estacionario.

Antecedentes

rhlR fue descrito por primera vez por Ochsner en 1994 (83), como un activador transcripcional tipo *luxR* necesario para la síntesis de ramnolípido. Mediante análisis posteriores referentes a la función de *rhlR*, se encontró que la proteína RhlR en conjunción con su autoinductor PAI-2 regula positivamente la expresión de una serie de exoproductos involucrados en la virulencia, el factor sigma RpoS, en la movilidad y en el sistema de secreción *xcp* (84,64,72,85,86).

rhlR se encuentra ubicado abajo del operon *rhlAB*, genes que codifican para la ramnosil transferasa, una enzima clave en la biosíntesis de ramnolípidos. Pearson et.al. 1997, por medio de experimentos tipo northern, encontró que *rhlR* se transcribe independientemente de *rhlAB*, formando un RNA mensajero de entre 0.9 a 1.3. kb. (15) en cultivos de *P. aeruginosa* crecidas en un medio bajo en nitratos y recoletado a una densidad de 0.9 a DO. 600 nm.

Se desconocen los elementos regulatorios de la región promotora del gen *rhlR*.

En el presente trabajo se pretende contribuir al esclarecimiento del mecanismo de la regulación transcripcional del gen *rhlR*, mediante la identificación y pruebas de funcionalidad de éstos elementos regulatorios.

OBJETIVO GENERAL

- Análisis de la regulación transcripcional de *rhlR* en *Pseudomonas aeruginosa*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la expresión del RNA mensajero de *rhlR* en las diferentes fases de crecimiento.
- Determinar el (los) sitio (s) de inicio de transcripción de *rhlR*.
- Hacer fusiones transcripcionales que contengan las regiones promotoras de *rhlR* con el gen reportero *lacZ*.
- Determinar la expresión transcripcional de *rhlR* en diferentes mutantes regulatorias de *P. aeruginosa*.
- Hacer análisis de la región promotora de *rhlR*.
- Proponer un sistema de regulación transcripcional de *rhlR*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia para dilucidar la regulación transcripcional de *rhIR*, se dividió en 3 principales rutas :

1.-Determinación de la expresión del mRNA de *rhIR* en distintas fases de crecimiento y condiciones de cultivo :

Se obtuvo RNA total de *P. aeruginosa* crecida en medio LB y PPGAS a diferentes densidades opticas, para posteriormente determinar el comportamiento transcripcional de *rhIR* por medio de la técnica de "dot blot".

2.- Análisis de la región promotora de *rhIR* :

Se localizarón el(los) sitio(s) de inicio de transcripción de *rhIR* por medio de la técnica de "primer extension", posteriormente mediante el análisis de la secuencia nucleotídica de esta región, se identificarón elementos regulatorios involucrados en su regulación transcripcional.

3.- Expresión de *rhIR* en en el fondo genético de diferentes mutantes regulatorias :

Con la ayuda de fusiones transcripcionales de la región promotora de *rhIR* con el gen reportero *lacZ*, se procedió a monitorear los niveles de expresión de *rhIR* en el fondo genético de diferentes mutantes regulatorias.

METODOLOGIA

CEPAS Y PLASMIDOS

Las cepas y plásmidos utilizados en el presente trabajo son descritos en la tabla IV.

CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

| Cepas o plásmidos | Características relevantes | Referencia |
|-------------------------------|---|--------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | |
| PAO1 | Cepa silvestre | 44 |
| 29-1 | Mutante PAO1, <i>met-9020 catA1 puuA1 lip1</i> | 44 |
| IBT8 | Mutante pleiotropica deficiente en la producción de ramnolípidos | -- |
| PG201 | Cepa silvestre. | 19 |
| 65E12 | PG201:: <i>Tn5</i> , mutante puntual en <i>rhIR</i> | 19 |
| PAK | Cepa silvestre. | |
| PAK-N1 | Mutante <i>rpoN</i> -de <i>P. aeruginosa</i> | |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| ET8000 | <i>rbs lacZ::IS1 gyrA hutC_K^c</i> | |
| resi13 | ET800 σ^{54} - | |
| DH5 α | <i>supE44, ΔlacU169, hsdR17, recA1 endA1, gyrA96, thi-1, relA 1</i> | 45 |
| Plásmidos | | |
| pUCP20 | Derivado de pUC19 estable en <i>E. coli</i> y <i>Pseudomonas</i> | 46 |
| pUO58 | Derivado de pUCP20 contiene los genes <i>rhIABRI</i> | 16 |
| pRW58 | Derivado de pUCP20 contiene el gen <i>rhIR</i> | Este trabajo |
| pMP220 | Plásmido Inc. P utilizado para construir | |

| | | |
|---------|--|--------------|
| pRD58-1 | fusiones transcriptionales con <i>lacZ</i> Derivado del plasmido pMMP220 con una fusión transcripcional <i>rhIR-lacZ</i> inserto de 520 nt. | Este trabajo |
| pRD58-2 | Derivado del plasmido pMMP220 con una fusión transcripcional <i>rhIR-lacZ</i> inserto de 720 nt. | |
| pRD58-3 | Derivado del plasmido pMMP220 con una fusión transcripcional <i>rhIR-lacZ</i> inserto de 870 nt. | |
| pRD58-4 | Derivado del plasmido pMMP220 con una fusión transcripcional <i>rhIR-lacZ</i> inserto de 1080 nt. | |
| pGMyC | pUCP20 conteniendo el gen <i>rhIR</i> bajo el promotor <i>lac</i> . (SmaI-KpnI) | |

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas de *Pseudomonas* utilizadas en éste trabajo se crecieron a 30 °C en medio PPGAS y LB

-Medio PPGAS:

NH₄Cl 0.02 M

KCl 0.02 M

Tris-HCl 0.12 M

glucosa 0.5%

peptona 1%

MgSO₄ 0.0016 M

AJUSTADO A pH 7.2

-NH₄Cl 0.02 M, KCl 0.02 M, Tris-HCl 0.12 M, glucosa 0.5%, peptona 1% y MgSO₄ 0.0016 M ajustado a pH 7.2). Este medio está limitado en fósforo inorgánico por lo que se optimiza la producción bacteriana de ramnolípidos (Mulligan, CN et. al 1989 J Biotechnol 12:199-210).

-Medio LB (Maniatis, 1982) :

para un litro

| | |
|-------------------------------|---------|
| NaCl | 10gr |
| peptona de caseína | 10gr |
| extracto de levadura | 5gr |
| aforar con H ₂ O a | 1000 ml |

ANTIBIOTICOS

Las concentraciones de los antibióticos utilizados en ug/ml, en las cepas fueron:

| | <u><i>Escherichia coli</i></u> | <u><i>Pseudomonas aeruginosa</i></u> | |
|-----|--------------------------------|--------------------------------------|-------------|
| | Medio LB | Medio LB | Medio PPGAS |
| Ap | 100 | -- | -- |
| Cm | 30 | 100 | 50 |
| Km | 30 | 200 | 100 |
| Nal | 20 | -- | -- |
| Sm | 100 | -- | -- |
| Sp | 100 | -- | -- |
| Tc | 10 | 300 | 150 |

MANIPULACION DE DNA y RNA

Los procedimientos estándar para purificación de DNA total y de plásmidos, digestiones con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa, purificación de DNA de geles de agarosa, ligación de DNA y transformación de *E. coli* se

realizaron según lo descrito por Sambrook et al., (1989). Las secuencias de DNA se determinaron por el método de Sanger (Sanger et al., 1977). La purificación de RNA se realizó según lo reportado por Barry y colaboradores (1992).

Los fragmentos de DNA obtenidos por las digestiones con las enzimas de restricción fueron separados en geles de agarosa al 1%, teñidos con EtBr (0.5µg/ml).

CRUZAS TRIPARENTALES

Las cruzas triparentales para movilizar y expresar plásmidos de *E. coli* a *Pseudomonas*, se hicieron de la siguiente manera:

La cepa receptora (*Pseudomonas*) y las *E. coli* (donadoras y ayudador) se sembraron en medio LB con antibióticos de selección positiva, ambas fueron crecidas hasta la fase estacionaria. Posteriormente se mezclaron (1:2:2) y se lavaron con H₂O para eliminar los antibióticos. Esta mezcla fue resuspendida en 10 mM de MgSO₄ y fue sembrada en medio LP sin antibiótico durante 16 horas. a 30 °C. Se hicieron diluciones para obtener colonias aisladas y se platearon en medio selectivo apropiado.

HIBRIDACION EN COLONIA

Este método nos proporciona la posibilidad de poder hacer búsquedas en cientos o miles de clonas bacterianas conteniendo secuencia de DNA de interés (librería genómica). Grunstein (1975) fue el primero en describir este método que consiste en la lisis *in situ* de colonias bacterianas que han crecido sobre filtros de nitrocelulosa, fijación de DNA a la membrana e hibridación con sondas marcadas con ³²P.

Procedimiento:

1.- Preparar cajas de Petri conteniendo medio LB con antibióticos

de selección positiva. Esterilizar y colocar los filtros sobre las cajas Petri conteniendo medio LB adicionado con antibióticos de selección positiva.

2.- Picar colonias sobre los filtros de nitrocelulosa. Hacer esto por duplicado.

3.- Incubar de 5 a 7 horas a 37 °C.

4.- Poner 1 ml de NaOH 0.4 N sobre una superficie plana, preferentemente un cristal.

5.- Sacar el filtro de las cajas de Petri y con la ayuda de pinzas colocarlo sobre el ml de NaOH para lisar las colonias. Incubar 20 minutos (evitar formación de burbujas ya que estas podrían impedir el lisado de células) .

6.- Lavar los filtros con SSC 3X y SDS 0.5 % durante 20 minutos a temperatura ambiente (se pueden dar tres cambios de solución en este tiempo).

7.- Poner los filtros sobre papel Whatman 3 MM para secarlos (si no se va a hibridar inmediatamente es necesario mantener los filtros en una solución de SSC 3X y a 4 °C).

8.- Colocar los filtros en tubos de hibridación conteniendo 10 ml de solución de prehibridación; Incubar 6 horas a 65 °C.

9.- Decantar la solución de prehibridación y agregar 10 ml de solución de hibridación

10.-Marcar el DNA sonda con ³²P, y desnaturalizarla por calor a una temperatura de 100 °C durante 3 minutos.

11.-Adicionar la sonda, incubar 12 horas a 65 °C.

12.-Sacar filtros de los tubo de hibridación y lavarlos con una solución de SSC 2X y SDS al 1%.

13.-Exponer los filtros a una pelicula sensible a rayos X.

Solución de prehibridación (10 ml.):

| | |
|-----------------------------|--------|
| Denhardt's 50X | 2 ml |
| SSC 20X | 2.5 ml |
| Buffer fosfatos | 1.0 ml |
| SDS 10 % | 0.5 ml |
| Esperma de salmón (5 mg/ml) | 150 µl |

La solución de hibridación es la solución de prehibridación pero carente de esperma de salmón y conteniendo la sonda marcada radioactivamente.

EXTRACCION DE RNA

- 1.-Crecer la bacteria en 200ml de medio PPGAS durante 14 horas.
- 2.-Centrifugar y lavar la pastilla celular con NaCl-MgSO₄ 50 mM.
- 3.-Centrifugar y resuspender la pastilla celular en un tubo de 1.5ml
- 4.-Centrifugar y adicionar 400 µl con DEPC al 0.1% (diluido en agua).
- 5.-Adicionar 3 µl de DEPC al 0.5% y 500 µl de acetona helada, mezclar suavemente y centrifugar a 10,000 rpm. durante 2 minutos.
- 6.-Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla celular en 300 µl de DEPC al 0.1%.
- 7.-Agregar 50 µl de lizosima (10mg/ml) preparada con DEPC al 0.5%, incubar a 37 C° durante 10 minutos.
- 8.-Adicionar 15 µl de proteinasa K (100 µg/ml) e incubar en hielo durante 10 minutos (si no se observa lisis, se puede adicionar mas proteinasa).
- 9.-Adicionar 3.5 µl de DEPC al 0.5% , 200 µl de fenol ácido precalentado a 70 °C y 150 µl de cloroformo. Mezclar manualmente y adicionar 120 µl de DEPC al 0.1%.
- 10.-Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos.
- 11.-Recuperar la fase acuosa en un tubo de 1.5 ml y adicionar 1ml

de etanol absoluto.

12.-Incubar a -20 °C durante 2 horas.

13.-Centrifugar a 12000 rpm. por 15 minutos y resuspender la pastilla en 50 µl de DEPC al 0.1%.

14.-Guardar a -20 °C.

ELECTROFORESIS DE RNA

GEL DE AGAROSA:

Agarosa al 1%-----0.5 grs.

Buffer MAE 5X-----10 ml

H2O-----36.5ml

BUFFER MAE 5X:

MOPS 0.2 M-----4.18grs.

Acetato de sodio 50 mM-----0.41grs.

EDTA 5 mM-----0.18grs.

Llevar a un pH final de 7.0 (adicionando NaOH) y un volumen de 100ml.

COLORANTE

Formamida 500 µl

colorante

Desnaturalizar previamente el RNA a 55 °C durante 15 minutos.

PRIMER EXTENSION

Los ensayos de extensión de iniciadores, para la identificación de los inicios de transcripción, se realizaron con 50 µg de RNA, purificado de cultivos crecidos a una de DO. 600 nm de 1.2 en medio PPGAS. La reacción de extensión de iniciadores se llevo a cabo de la siguiente manera:

-Reacción de marcaje con gama ATP (32 P), de los oligonucleótidos. Esta reacción se llevó a cabo con 1 U de la enzima polinucleótido cinasa (Boheringer), y 20 picomoles del oligonucleótido, el volumen de reacción fue de 20 μ l. Se incubó por 1 hora a 37°C.

-Reacción de extensión:

Se utilizó el sistema de Amersham, siguiéndose las instrucciones del fabricante. Se utilizaron, en la reacción, las siguientes cantidades, RNA, 50 μ g; NaCl 2.5 M, 1.76 μ l; Tris HCl 1M, 0.66 μ l; oligonucleótido marcado (32 P), 5 picomoles; inhibidor de enzimas degradadoras de RNA, 25 U (Boehring), DTT 10 mM, 3.7 μ l, desoxiribonucleótidos (dATP, dGTP, dTTP y dCTP) 40mM, 2 μ l y 10 U de la enzima Transcriptasa reversa (Amersham). El RNA junto con el cloruro de sodio, la solución de TrisHCl y los oligonucleótidos, se desnaturalizaron a una temperatura de 95 °C por 3 minutos. Posteriormente, se le añadió el resto de los reactivos, ajustando la reacción a un volumen de 40 μ l. La extensión se realizó a 42 °C durante 1 hora. El DNA copia (cDNA), resultante de la reacción de la transcriptasa reversa, se precipitó con 10 μ l de acetato de amonio 10M y 100 μ l de etanol por un período mínimo de 3 horas (o toda la noche). Después de centrifugar, el cDNA se lavó dos veces con etanol al 70%. El cDNA se resuspendió en un volumen de 8 μ l. Simultáneamente, se realizó una secuencia nucleotídica, usando el mismo iniciador para identificar el sitio de inicio de la transcripción.

PRECIPITACION DEL DNA MARCADO RADIATIVAMENTE

Este protocolo nos permite precipitar el DNA que ha sido incorporado y de esta forma podemos medir con la ayuda de un

contador de centelleos el porcentaje de incorporación de la sonda.

1.-Añadir 300 μ l de la solución RPE y 600 μ l de propanol a la solución de marcaje. Mezclar con la ayuda de una pipeta.

2.-Incubar a -20 °C durante 30 minutos.

3.-Centrifugar 10 minutos en una microcentrifuga a 14000 rpm.

4.-Decantar el sobrenadante (tener mucho cuidado ya que es liquido radioactivo)

5.-Resuspender en 200 μ l de NaOH 0.1 M.

*Solución RPE: 0.1 mg/ml de DNA de esperma de salmón. 10 mM EDTA y 2.5 M de acetato de amonio.

MEDICION DE ACTIVIDADES DE LA β -GALACTOSIDASA

a) PRUEBA DE LA β -GALACTOSIDASA PARA *Pseudomonas*
(Roseen et al. 1985, modificación de la prueba de Miller 1972)

1.-Las cepas fueron crecidas en medio PPGAS durante 3 o 12 horas (D.O.₆₀₀ de 0.5 a 0.6) antes de llegar al paso 2.

2.-Diluir a 0.05 D.O.₆₀₀ inoculando el precultivo en medio PPGAS

3.-Incubar con agitación a 30 °C durante 12-14 horas.

4.-tomar un ml y centrifugar 5 minutos a 5000 rpm.

5.-Decantar sobrenadante y resuspender la pastilla celular en 1 ml de MgSO₄ 10 mM.

6.-Tomar 100 μ l para la prueba de Lowry (determinación de proteína) y guardarlos en hielo.

7.-Inocular los 100 μ l en buffer Z (por triplicado) e incubar a 29 °C durante 5 minutos.

8.-Agregar 1 gota de SDS 0.2 % y dos gotas de cloroformo.

9.-Mezclar vigorosamente con la ayuda de un vortex durante 10

segundos.

8.-Para empezar la reacción, agregar 200 μ l de ONPG (4 mg/ml en 0.1 M de buffer fosfatos pH 7.0).

9.-Parar las reacciones a diferentes tiempos, agregando 500 μ l de Na_2CO_3 1 M.

10.-Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm.

11.-Recuperar el sobrenadante en otro tubo eppendorf.

12.-Tomar 1 ml y leer a 420 nm.

Se utilizó O-Nitrofenil- β -D-galactosido (ONPG) como sustrato para la enzima β -galactosidasa, por ser su producto (O-nitrofenol) de fácil detección colorimétrica.

Se agregó carbonato de sodio (Na_2CO_3 , 1 M) para intensificar el color y parar la reacción, la cual es monitoreada a 420 nm.

Buffer Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 60 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM, KCl 10 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 mM, β -mercaptoetanol 50 mM) es preparado como sigue:

Para un litro, mezclar

| | |
|--|-------------|
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 16.1 grs. |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 5.5 grs. |
| KCl | 0.75 grs. |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0.0247 grs. |
| β -mercaptoetanol | 2.7 ml |

No se esteriliza en autoclave; ajustar el pH a 7.0 y guardar a 4 $^{\circ}\text{C}$.

El ONPG se prepara añadiendolo a buffer fosfatos 1 M. El buffer fosfatos es una solución equimolar de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.5 M de ambos) en H_2O .

b) DETERMINACION DE PROTEINA

Modificación del método de Lowry (Peterson et al. 1977)

Reactivos stock:

a) Cobre-tartrato-carbonato (CTC) Añadir a una solución de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) 0.2 % y tartrato de potasio 0.4 %, una solución de carbonato de sodio (NaCO_3) 20 %. Hacer esto lentamente con la ayuda de un agitador magnético.

Las concentraciones de la solución final son:

| | |
|--|-------|
| $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ | 0.1 % |
| tartrato de potasio | 0.2 % |
| NaCO_3 | 10 % |

Esta solución es estable durante 2 meses a 20 °C.

- b) SDS 10 %
- c) NaOH 0.8 N
- d) Folin (Fisher)

Procedimiento:

- 1.- Preparar reactivo A mezclando partes iguales de los reactivos a, b, c y H_2O . Se puede formar un precipitado oscuro que no afecta la determinación si se mezcla bien antes de usarse.
- 2.- Preparar reactivo B mezclando 1 parte de Folin y 5 de H_2O (estable a 20 °C en botella ámbar).
- 3.- Preparar stock de albúmina 1mg/ml (diluida a 0.5mg/ml debe dar a 280 nm, 0.33 de absorbancia).
- 4.- Hacer diluciones de la albúmina 25 μg , 50 μg , 75 μg y 100 μg en 100 μl de MgSO_4 10 mM , para hacer curva estándar.
- 5.- Tomar las muestras y añadir 1 ml de reactivo A, mezclar.
- 6.- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente (preferentemente a 20 °C).
- 7.- Añadir 0.5 ml de reactivo B, mezclar vigorosamente inmediatamente.
- 8.- Leer después de 30 minutos a 750 nm. (es recomendable leer las muestras en un lapso de 2 horas. a menos existan controles en el

mismo grupo de tubos. La pérdida de color es de 1-2 % por hora a temperatura ambiente.

PREPARACION DE CELULAS "COMPETENTES"

PRINCIPIO

Las cepas de *Escherichia coli* cuando son sometidas a la acción del cloruro de calcio, experimentan la formación de una serie de poros en su pared celular los cuales facilitan la transferencia de DNA cuando éste se pone en contacto con un DNA transformante. Las células así tratadas están en un estado de competencia.

PROTOCOLO

- 1.-La cepa se pone a crecer en un tubo de ensaye, con 3 ml de LB (NaCl 10gr , peptona de caseína 10gr y extracto de levadura 5gr por aproximadamente 5 a 7 horas.
- 2.-Con éste cultivo se inoculan 0.5ml a un matraz de 100 ml del mismo medio y se deja crecer durante 4 horas.
- 3.-Una vez crecidas las células se centrifugan durante 10 minutos a 6000 r.p.m.
- 4.-Se desecha el sobrenadante y la pastilla obtenida se resuspende en 25 ml de NaCl 10mM frío.
- 5.-Se centrifuga 5 minutos a 6000 r.p.m. y 4°C.
- 6.-Decantar el sobrenadante y resuspender en 20 ml de buffer de transformación (MgCl 0.5M, Tris 0.5M y CaCl 0.7M.).
- 7.-Se deja en hielo durante 20 minutos.
- 8.-Se vuelve a centrifugar 10 minutos. a 4 °C.

9.-Decantar nuevamente el sobrenadante y agregar a la pastilla 1ml de buffer de transformación. Hasta aquí ya contamos con células competentes. Los siguientes pasos constituyen el protocolo de transformación.

TRANSFORMACION

10.-En tubos de ensaye, se le pone a cada tubo 1 ml de buffer de transformación con 200 μ l de células competentes y se le agrega el DNA transformante.

11.-Se ponen una hora en hielo, durante éste período se recomienda agitarlos suavemente a intervalos de 20 minutos, para favorecer la transferencia.

12.-Después se ponen a incubar 2 minutos a 42°C, con la finalidad de que las células se reactiven metabólicamente.

13.-Se le agregan 3 ml de medio LB líquido y se le incuba a 37°C con agitación durante 1 hora, para recuperar la viabilidad de las transformantes.

14.-Se plaquean 100 μ l de estos tubos de crecimiento sobre cajas Petri con LB-sólido y el antibiótico de selección positiva.

15.-Las clonas transformantes se analizan por minipreparaciones siguiendo la modificación de Birnboim y Doly del protocolo de lisis alcalina (Maniatis 1992).

ELECTROPORACION:

Fundamento:

La electroporación, proporciona un método para la transformación de *E. coli* con una eficiencia más alta que los métodos fisico-químicos utilizados hasta ahora. El mecanismo propuesto es que, la acción de un campo eléctrico, considerado como el gradiente de voltage entre dos electrodos, induce la

apertura de canales que permiten la entrada del DNA. La fuerza del campo eléctrico y el tamaño de las células determinan el voltage que puede pasar a través de las células y este voltage parece ser la manifestación más importante del efecto en la electroporación.

PROTOCOLO DE ELECTROPORACION:

Preparación de células:

- 1.- Inocular un litro de medio Luria (1% Bactotripton, 0.5% de extracto de levadura, 0.5% de NaCl) con 1 ml de medio de 3ml crecidos durante toda la noche.
- 2.- Crecer las células a 37°C, con agitación fuerte, a una A_{600} de 0.5 a 0.8 (los mejores resultados se obtienen cuando las células se obtienen al principio de la fase logarítmica de crecimiento; la densidad apropiada de células por lo tanto depende de la cepa y las condiciones de cultivo).
- 3.- Cosechar en frascos adecuados y enfriar en hielo durante 15 o 30 minutos, centrifugar en un rotor frío a 4000X g.max. durante 15 minutos.
- 4.- Lavar las células, resuspendiéndolas en 500 ml de agua estéril y fría. Centrifugar a 4000Xgmax durante 5 minutos y desechar el sobrenadante.
- 5.- Repetir el lavado de las células con 250ml de agua y recentrifugar.
- 6.- Resuspender en glicerol al 20% , en tubos eppendorf estériles para tener una concentración final de $1-3 \times 10^{10}$ células/ml.
- 7.- Las células así preparadas pueden mantener us eficiencia de transformación congeladas a -70 °C durante 6 meses.

TRANSFORMACION.

- 1.-Descongelar lentamente las células colocándolas en hielo . tomar las cubetas de electroporación estériles y colocarlas en hielo.
- 2.-En un tubo eppendorf de 1.5 ml frío, mezclar 100 μ l de células con 3 μ l de DNA producto de una reacción de ligación.
- 3.-Colocar el aparato Gene Pulser a 25 μ F Y 2.50kV para cubetas de 0.2cm. El controlador de pulso a 200W.
- 4.-Transferir la mezcla de DNA y células a una cubeta de electroporación, procurar que quede todo el fondo y que no queden burbujas que pueden favorecer el paso heterogéneo del impulso eléctrico. Colocar la celda entre los polos perfectamente.
- 5.-Dar el pulso eléctrico.
- 6.-Remover la cubeta de la cámara e inmediatamente adicionar un ml de medio LB a la cubeta e inmediatamente resuspender las células con una pipeta Pasteur. (La adición rápida del medio LB después del choque eléctrico es importante para la recuperación de las transformantes).
- 7.-Transferir las células a un tubo de ensaye de 10 ml e incubar a 37°C con agitación constante durante 1 hora.
- 8.-Analizar los parámetros del pulso. La constante de tiempo debe estar entre 4 y 5 msegundos. La fuerza del campo puede ser calculada como el voltaje real (V)/el ancho de la cubeta (cm).
- 9.-Plaquear sobre medio selectivo.

OBTENCION DE DNA PLASMIDICO

Lisis alcalina: (Modificación de Birnboin y Doly).

Principio:

Cuando se pone una solución de bacterias en contacto con una

solución de NaOH y SDS, éste último degrada la pared celular permitiendo una lisis que libera el contenido intracelular, entre ellos el DNA, mismo que de momento se rompería si no se adicionara una solución que cumple las funciones de evitar un fuerte choque osmótico debido a su pH y a su capacidad isotónica.

Protocolo: (minipreparaciones)

1.- Inocular 5ml de medio LB conteniendo el antibiótico apropiado e inocular una sola colonia. Incubar a 37°C toda la noche con agitación.

2.-Tomar 1.5 ml del cultivo en un tubo eppendorf y centrifugar un minuto en una microfuga. Mantener el resto del cultivo a 4°C.

3.-Remover el medio por aspiración, dejando la pastilla lo más seca posible.

4.-Resuspender la pastilla con ayuda de un vortex en 100 µl de una solución de:

50 mM de glucosa.

10 mM de EDTA

25 mM de Tris.HCl (pH 8.0).

5.-Dejar durante 5 minutos a temperatura ambiente. La tapa del tubo debe estar abierta durante éste período.

6.-Adicionar 200µl de una solución fresca de:

0.2N de NaOH

1% de SDS

Cerrar la tapa y mezclar el contenido invirtiendo el tubo dos o tres veces rápidamente (no mezclar con vortex) y dejarlo en hielo 5 minutos.

7.-Adicionar 150µl de una solución fría de acetato de potasio (pH 4.8) el cual se prepara con 60ml de acetato de potasio 5M,

adicionandole 11.5 ml de ácido acético glacial y 28.5 ml de agua. La solución resultante es 3M con respecto al potasio y 5M con respecto al acetato.

8.-Cerrar el tubo y mezclar con un vortex ligeramente en una posición invertida durante 10 segundos. Dejarlo en hielo durante 5 minutos.

9.-Centrifugar durante 15 minutos en una microfuga a 4°C.

10.-Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

11.-Adicionar un volumen igual de fenol-cloroformo. Mezclar con ayuda del vortex y después centrifugar durante dos minutos en la microfuga, transferir el sobrenadante a un tubo limpio.

12.-Adicionar 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente, mezclar con un vortex y dejar a temperatura ambiente durante 2 minutos.

13.-Centrifugar 15 minutos en una microfuga a temperatura ambiente.

14.-Remover el sobrenadante. Dejar el tubo en posición invertida sobre una toalla para permitir salir el etanol.

15.-Adicionar 1 ml. de etanol al 70%. Mezclar ligeramente y entonces recentrifugar.

16.-Nuevamente decantar todo el sobrenadante. Secar la pastilla en un secador al vacío.

17.-Adicionar 50µl de TE 10:1 (Tris 10nM y EDTA 10nM a pH 8.0) conteniendo RNAasa (20µg), y mezclar ligeramente.

18.-Pasar 10µl de la solución a un tubo eppendorf, adicionar 1.2 µl del buffer de digestión apropiado y una unidad de la enzima de restricción deseada/µg de DNA. Incubar de una a dos horas a la temperatura apropiada y guardar el resto a -20°C.

19.-Analizar los fragmentos del DNA por electroforesis en minigel

de agarosa al 1%.

EXTRACCION DE DNA POR GRADIENTE DE DENSIDAD EN CsCl

- 1.-Crecer en 3 ml de LB la cepa con el plásmido a purificar, adicionándole el antibiótico al medio selectivo.
- 2.-Inocular con 1.5 ml de éste medio con las células crecidas a un matraz con 400 ml de LB con el antibiótico utilizado en el primer crecimiento.
- 3.-Centrifugar a 5 K durante 10 minutos a 4°C para precipitar las células.
- 4.-Resuspender en 5 ml de sacarosa al 25% con 50 mM de Tris:HCl a pH 8, en hielo.
- 5.-Adicionar 1 ml de 10 mg/ml de lisozima en 250mM de Tris:HCl pH8 y dejarlo durante 5 minutos en hielo .
- 6.-Adicionar 2.8ml de 0.25M de EDTA pH8 y dejarlo en hielo durante 5 minutos; posteriormente transferirlo a un tubo de centrifuga Sorvall.
- 7.-Adicionar 8.8 ml de 10% de Tritón 100X, 50mM de Tris:HCl pH8 y 60mM de EDTA.
- 8.-Centrifugar a 15 o 20K en un rotor SS34 a 4°C.
- 9.-Tomar el sobrenadante y pasarlo a un tubo Corex.
- 10.-Adicionarle 6 ml de 30% de PEG y 1.5M de NaCl.
- 11.-Centrifugar a 5K durante 10 minutos en el mismo rotor.
- 12.-Decantar el sobrenadante y secar la pastilla tanto como sea posible en un secador al vacío.
- 13.-Resuspender en 2ml de 50mM de Trisy 10mM de EDTA, despues adicionar 50µl de una solución de RNAsa (10mg/ml), e incubar 30minutos a 37°C.
- 14.-Medir el volumen total.

- 15.-Por cada ml agregar 1gr de CsCl .
- 16.-Adicionar 80µl de EtBr (10mg / ml)por cada ml de disolución.
- 17.-Centrifugar 10minutos a 9K para eliminar residuos.
- 18.-Poner el sobrenadante limpio en tubos de ultracentrífuga.
- 19.-Equilibrar exactamente los volúmenes con una solución de 10mM de EDTA, 50mM de Tris más 1 gr de CsCl por cada ml mas 80µl de EtBr por cada ml de solución total.
- 20.-Centrifugar durante 10 horas a 20°C.
- 21.-De las bandas formadas extraer la banda inferior que contiene el plásmido superenrollado.
- 22.-Extraer el EtBr con isopropanol y 20X SSC dos o tres veces hasta dejar la solución clara, libre de bromuro de etidio.
- 23.-Diluir el DNA con 2 volúmenes de H₂O y precipitar con 3 volúmenes de etanol absoluto para un volúmen de DNA.
- 24.-Resuspender en 3ml de TE.
- 25.-Precipitar nuevamente con 3 volúmenes de etanol al 70% y 0.1 volúmen de acetato de sodio, en éste momento se observa un precipitado visible si la concentración de DNA resultante es adecuada.
- 26.-Congelar los tubos a -70°C durante 10 minutos.
- 27.-Centrifugar 10 minutos a 4°C.
- 28.-Lavar al menos 2 veces con etanol al 70%.
- 29.-Resuspender en 300µl de TE.
- 30.-Medir la concentración al espectrofotómetro

RESULTADOS Y DISCUSION:

RELACION ENTRE LA FASE DE CRECIMIENTO Y LA EXPRESION TRANSCRIPCIONAL DE *rhIR*.

Con el proposito de analizar la dependencia de la densidad celular en la expresi3n transcripcional de *rhIR* de *P. aeruginosa*, se procedi3 a hacer un "dotblot" con RNAs extraidos de cultivos crecidos a diferentes densidades ($DO_{600\text{ nm}}$: 0.4., 1.0., 1.2 y 1.6), y utilizando como sonda una regi3n intrag3nica de *rhIR* (obtenida de una restricci3n BamHI-BglIII de pRW58). Los resultados de 3ste experimento se muestran en la Figura 7.

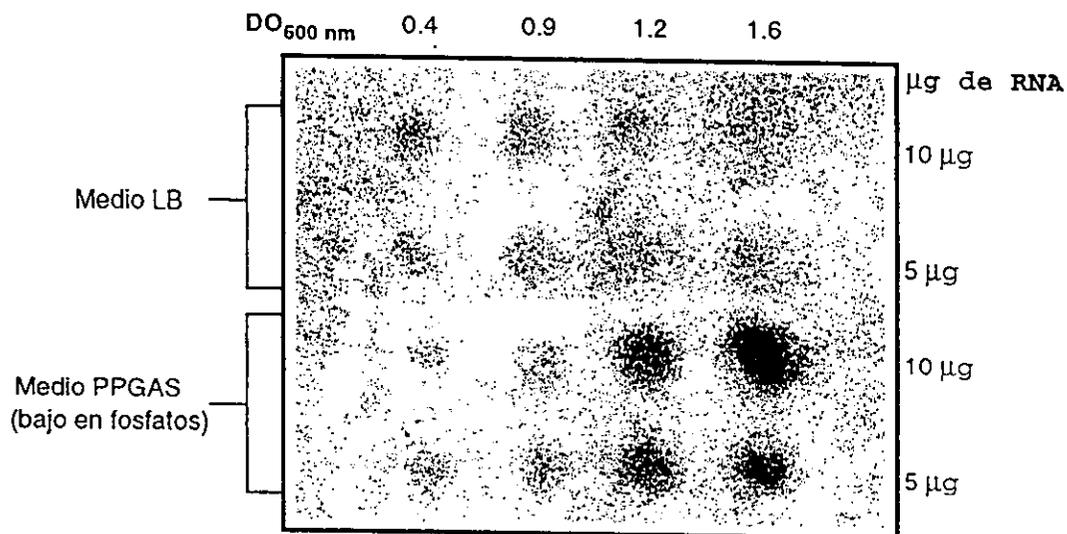


Figura 7. -Dotblot del RNA total de *P. aeruginosa* recolectado en diferentes etapas de crecimiento ($DO_{600\text{ nm}}$ 0.4, 0.9, 1.2 y 1.6). Se utilizo como sonda una regi3n intrag3nica de *rhIR* (BamHI-BglIII).

Se observ3 que cuando la bacteria es crecida en medio LB (medio rico en nutrientes), la expresi3n transcripcional de *rhIR* permanece en niveles basales en todas las densidades celulares probadas, mientras que en un medio bajo en fosfatos (medio PPGAS) la expresi3n de *rhIR* depende de la densidad celular, ya que la

expresión transcripcional de *rhIR* se activo fuertemente a partir de una DO₆₀₀ de 1.0, entrando a la fase temprana de crecimiento estacionario. Estos resultados referentes a la relación entre la densidad celular y la expresión de *rhIR*, son compatibles con los resultados reportados previamente por Pearson et al 1997 (15).

En todos los experimentos posteriores para localizar los inicios de transcripción, se tomó la condición de máxima expresión de *rhIR* detectado en el medio PPGAS (densidad de 1.4 a DO₆₀₀ nm.)

LOCALIZACION DE LOS INICIOS DE TRANSCRIPCION

Para localizar los inicios de transcripción de *rhIR*, se realizó un "primer extension" con el oligo intragénico pErhl (diseñado en la región +48 nt del orf de *rhIR*), tomando como templado el RNA total aislado de dos cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 crecidos en medio PPGAS a 30 °C y 37 °C. (figura 8).

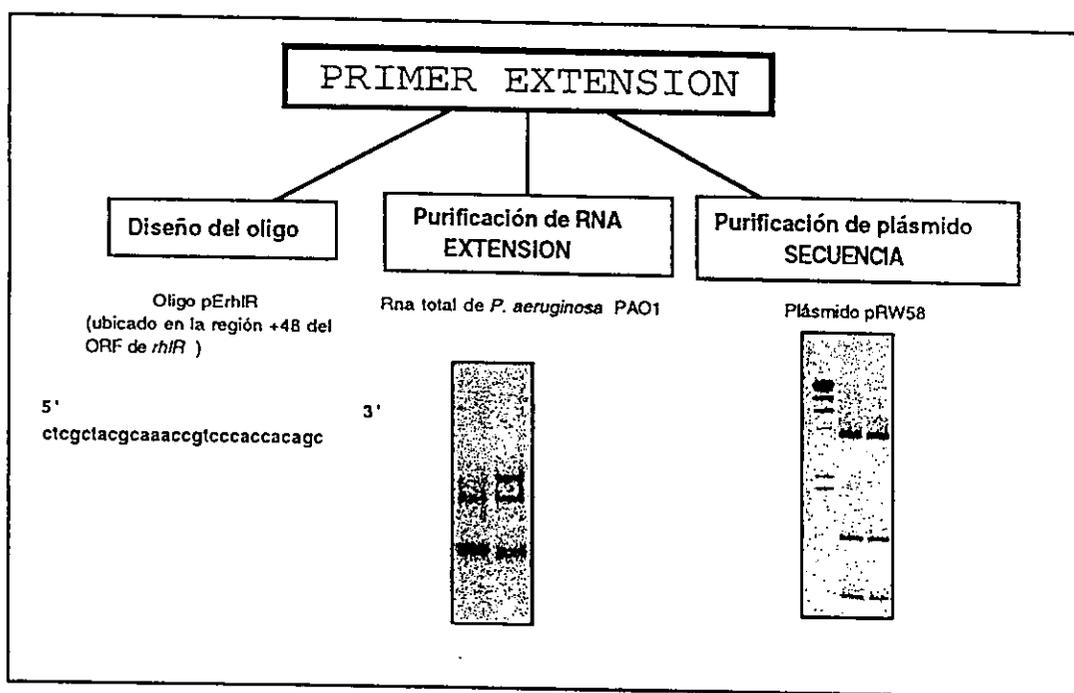


Figura 8.-Muestra el RNA total utilizado como templado para la reacción de extensión, el templado pRW58 para la secuencia nucleotídica y el primer utilizado en las dos reacciones.

Para determinar la ubicación de los sitios de inicio de la transcripción, en la secuencia nucleotídica, se secuenció el cósmido pU058 (que contiene los genes *rhIABRI*), utilizando el mismo oligo pErhl.

Se encontró que *rhIR* puede tener cuatro posibles sitios de inicio de transcripción (figura 9). Este resultado también nos sugirió que la expresión transcripcional de *rhIR* es independiente de la temperatura, ya que las reacciones de extensión fueron muy semejantes en los RNAs totales extraídos de bacterias crecidas tanto a 30 como a 37 °C.

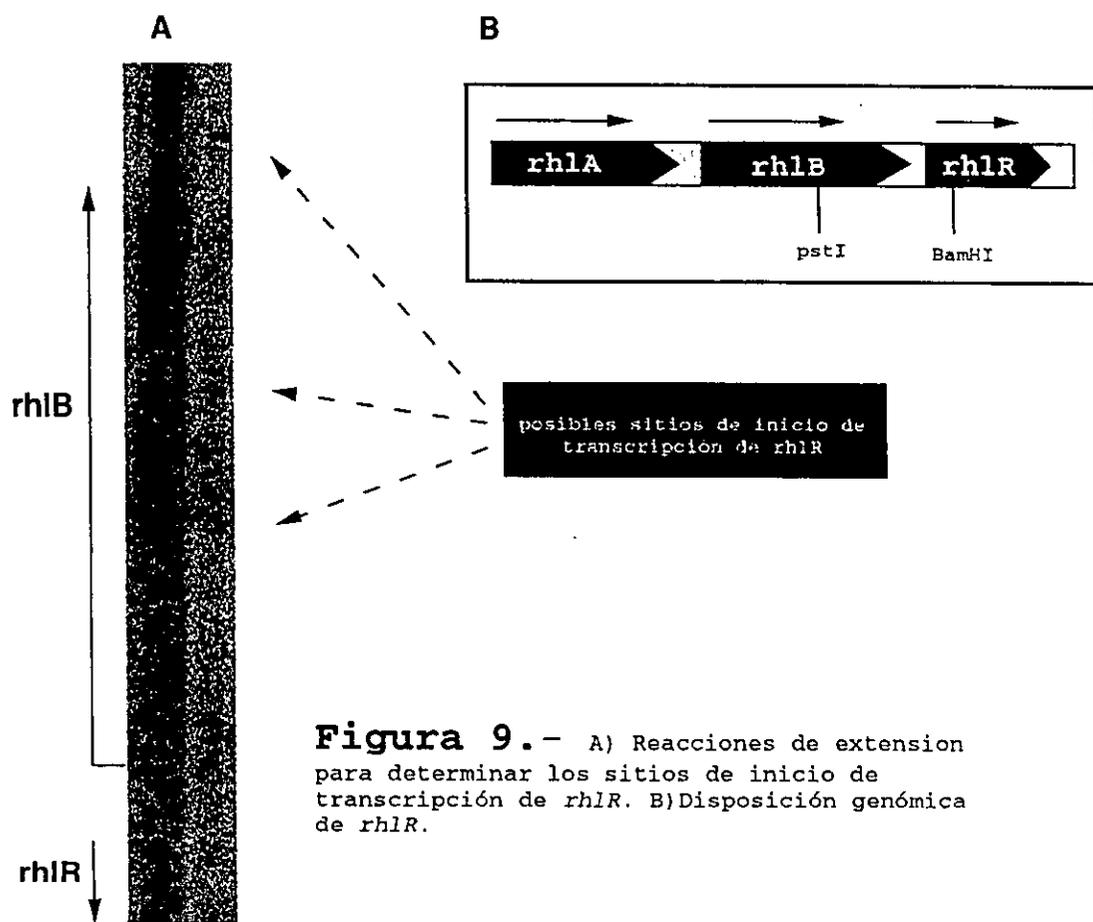


Figura 9. - A) Reacciones de extensión para determinar los sitios de inicio de transcripción de *rhIR*. B) Disposición genómica de *rhIR*.

Debido a la lejanía (con respecto al inicio de traducción, ATG) de los posibles sitios de inicio de transcripción y a la baja resolución de la secuencia nucleotídica, fue necesario diseñar otros dos oligos (oligos pErhl-2 y pErhl-3 (figura 10)) que nos dieran la posibilidad de ubicar los inicios de transcripción en la secuencia nucleotídica.

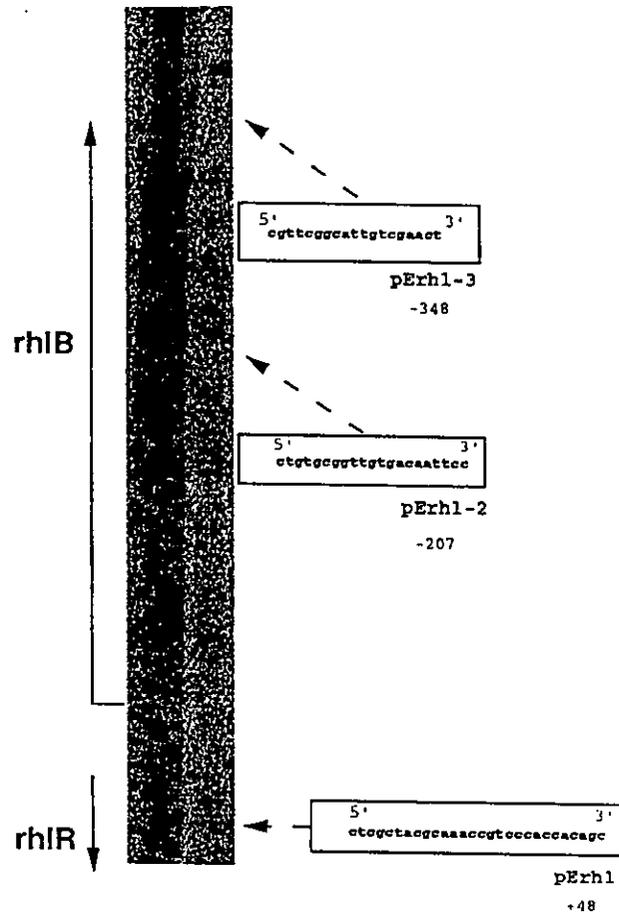


Figura 10.-Oligos utilizados para localizar los inicios de transcripción en la secuencia nucleotídica. Oligo pErhl de la región codificante de *rhIR* (+48); oligo pErhl-2, región -207; oligo pErhl-3, región -348.

Los posibles inicios de transcripción de *rhIR* se encontraron en las regiones -206, -292, -470 y -664, todos localizados en la región codificante correspondiente a *rhIB* (orf de *rhIB*). Para facilitar el manejo de los datos estos inicios fueron nombrados

inicio 1, 2, 3 y 4 respectivamente (figura 11).

Es importante hacer notar que Ochsner et al 1994 (200) encontró por homología de secuencia, un consenso para el pegado de la proteína sigma 70 en la región en la region -36 con respecto al inicio de traducción., aunque las condiciones probadas para la búsqueda de los inicios de transcripcion de *rhIR* no mostraron inicios en la zona correspondiente al consenso para sigma 70 es posible que este supuesto sitio de inicio de transcripcion sea funcional, pero se exprese a niveles basales no detectables en las condiciones probadas.

IDENTIFICACION DE ELEMENTOS PROMOTORES EN CIS

Con el subsecuente análisis de las regiones nucleotídicas presentes arriba de los inicios de transcripción, previamente ubicados, se pudo identificar una posible secuencia promotora con alta homología al consenso de sigma 54 en la region -314 nt y una región invertida repetida en la región -347 nt, que es muy semejante al supuesto sitio de unión de la proteína RhIR en el promotor de *rhIA*, tipo caja lux (Ochsner et al. 1994), ambas regiones se encuentran arriba del segundo sitio de inicio de transcripción (inicio -292) (FIGURA 12).

ANALISIS DE LA TRANSCRIPCION DEL PROMOTOR TIPO sigma 54

-EXPRESION EN *P. aeruginosa* :

Con el propósito de analizar la funcionalidad de la zona promotora presente arriba del segundo inicio de transcripción (inicio -291), cuyas características son la presencia de un sitio consenso para sigma 54 y un posible sitio de pegado de la proteína RhIR, se construyó una fusión transcripcional que contiene los inicios de transcripción uno, dos y el gen reportero

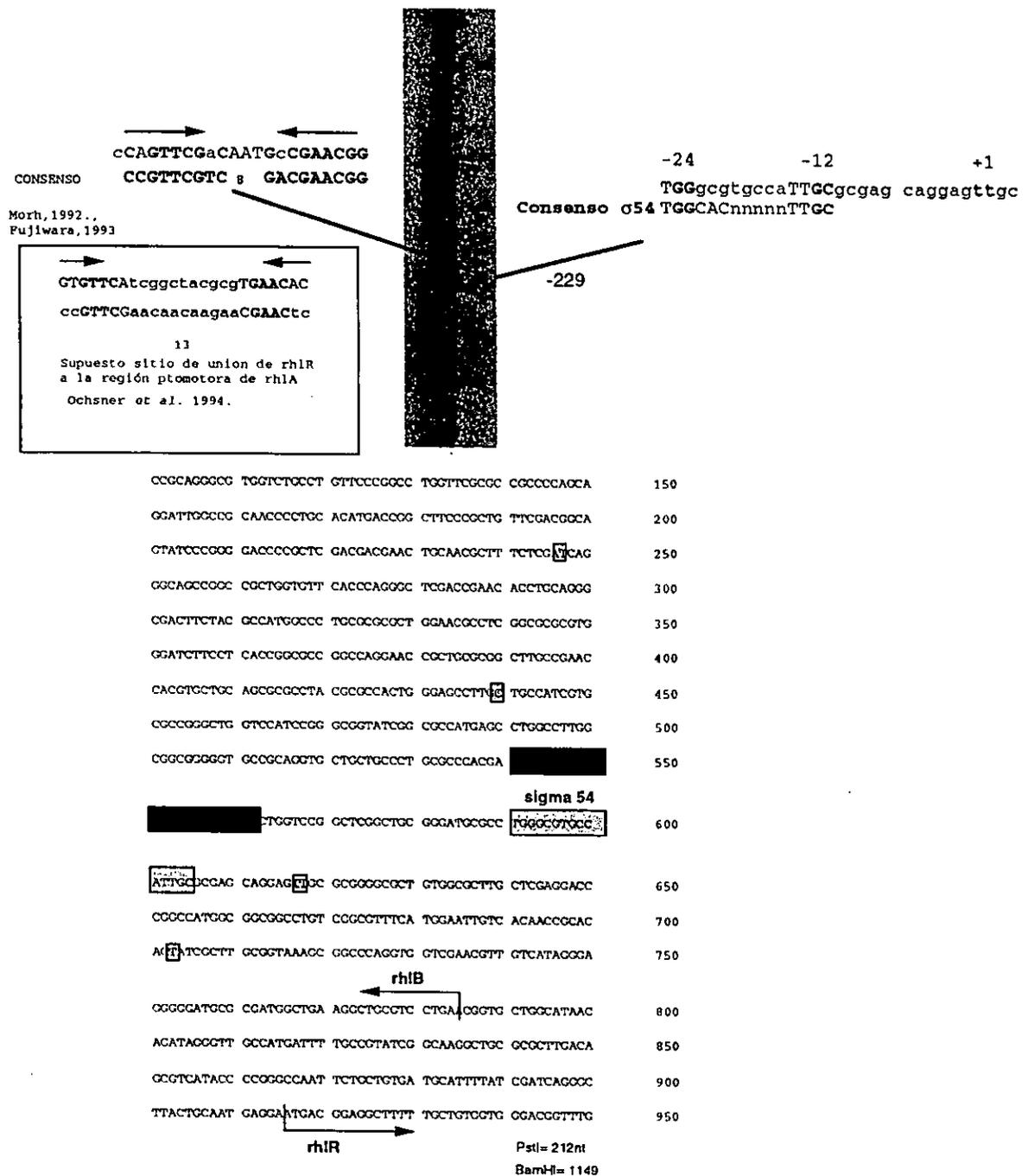


Figura 12.-Muestra los posibles elementos regulatorios indispensables para la regulación transcripcional de *rhIR*. Un sitio de pegado para el factor de transcripción sigma 54 (-314) y un región con alta homología al concenso de pegado para la proteína tipo *luxR* (-347).

lacZ (denominada pRD58-2). Esta fusión transcripcional se obtuvo liberando por restricción un fragmento PstI-BamHI de 720pb del cósmido pRW58, para posteriormente clonarlo en el vector pMP220 (figura 13).

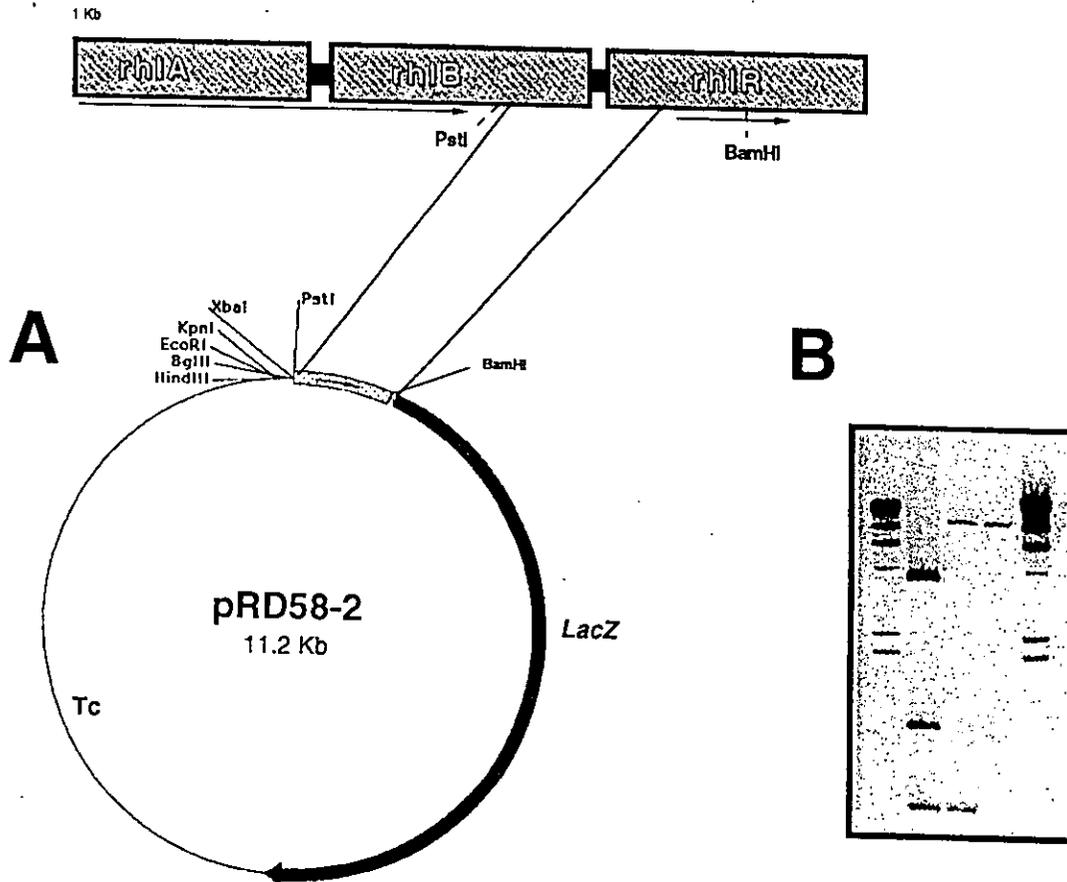


Figura 13.-Muestra la clonación de la región promotora de *rhIR*, que comprende los inicios de transcripción 1 y 2 (fusión pRD58-2). A) Para hacer la fusión transcripcional se utilizó el vector pMP220, clonando un fragmento de 720 pb, digerido con las enzimas de restricción PstI-BamHI. B) Muestra la restricción enzimática PstI-BamHI de pRW58, la fusión transcripcional pRD58-2 y pMP220 (carriles 1, 2 y 3 respectivamente).

Este vector pMP220 diseñado para la construcción de fusiones transcripcionales, carece de selección positiva a la ligación del inserto, por lo que fue necesario hacer hibridación en colonia para la búsqueda de ésta fusión transcripcional (figura 18).

La fusión transcripcional pRD58-2 se transfirió por conjugación a las mutantes regulatorias de *P. aeruginosa* *rhIR*⁻, σ 54⁻ y a la mutante pleiotropica IBT8, para posteriormente analizar su expresión transcripcional mediante el gen reportero *lacZ*. Los resultados se muestran en la (figura 14).

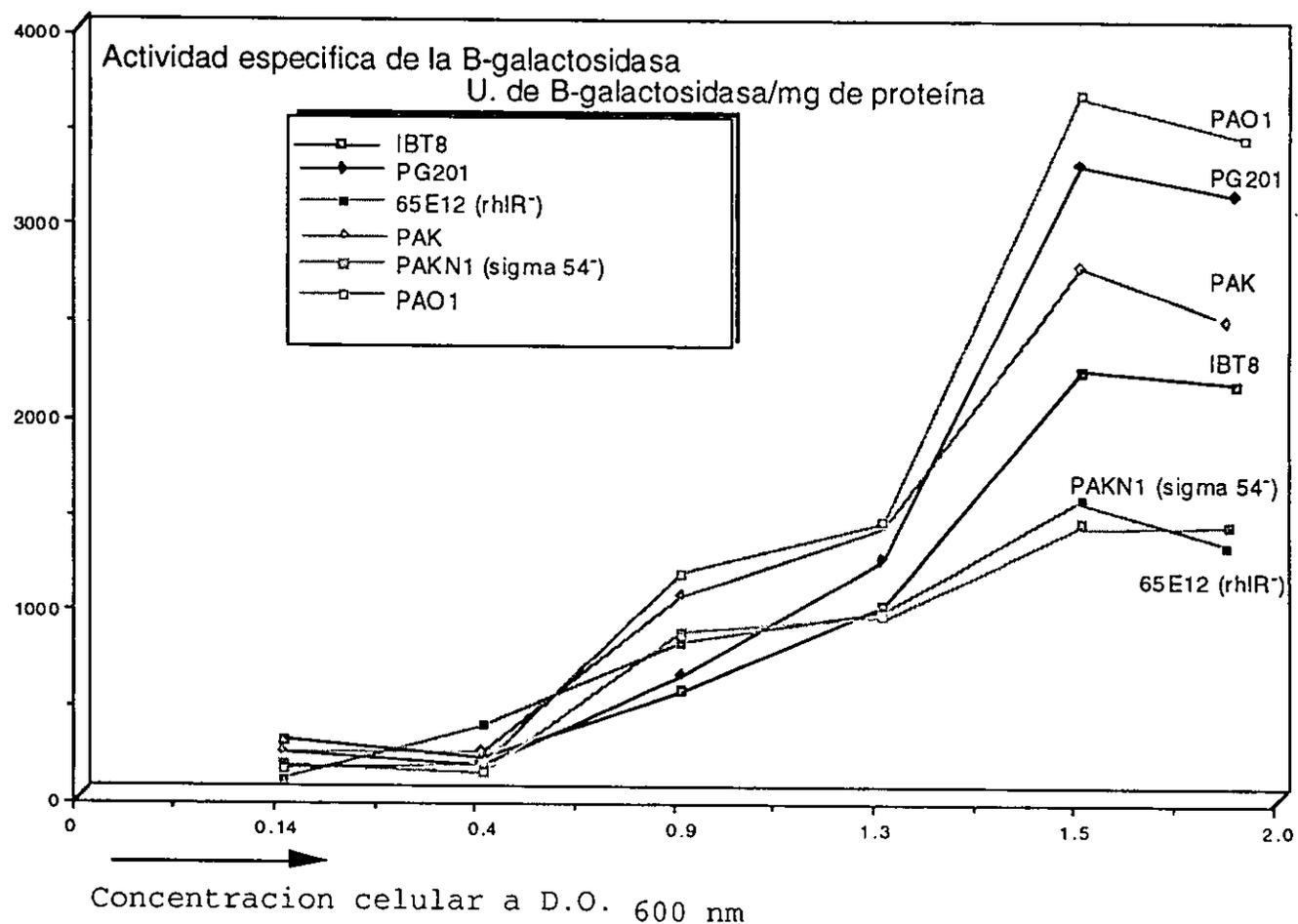


Figura 14.-Muestra la expresión de la fusión transcripcional pRD58-2, en diferentes etapas de crecimiento, expresada en unidades de B-gal/mg de proteína.

Ambas mutantes sigma 54⁻ y *rhlR*⁻, conservaron la capacidad de responder a la densidad celular, pero redujeron su expresión a un 50% con respecto a su silvestre, mientras que en la pleiotropica IBT8 se afecto su expresión en un 30 % con respecto a su silvestre.

-EXPRESION EN *E.coli* :

La fusión transcripcional pRD58-2 se introdujo por eletroporación a la mutante sigma 54⁻ de *E.coli* (Resi-13), que contiene además una construcción de *rhlR* fusionado al promotor lac (pGMyC). Esta bacteria fue crecida en medio LB, hasta fase estacionaria para su análisis posterior. Los resultados de éste experimento se muestran en la (figura 15).

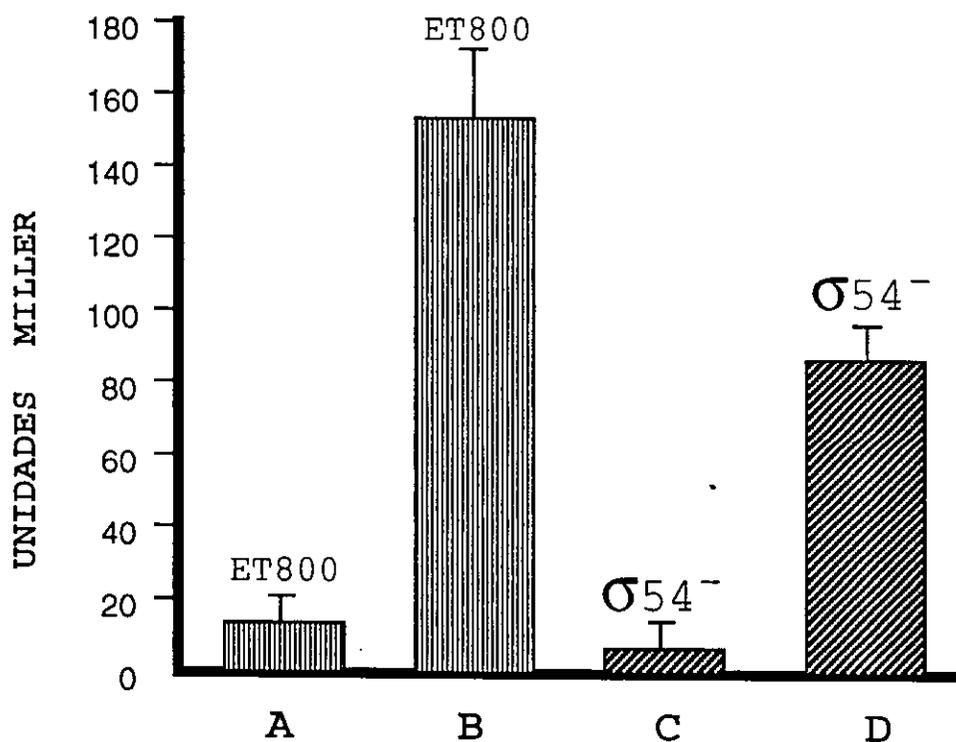


Figura 15.- Muestra la expresión de la fusión transcripcional pRD58-2 en el fondo genético de *E. coli* ET8000 sigma 54⁻, crecida hasta fase estacionaria (D.O._{600nm} 1.2). A y C fueron crecidas en ausencia de IPTG, B y D en presencia de IPTG.

Se observó que la expresión de la fusión pRD58-2 en la mutante sigma 54⁻, disminuyó en un 50% con respecto a su silvestre, éstos datos coinciden con los observados en el fondo genético de *P. aeruginosa*.

La expresión de la fusión pRD58-2 fue independiente de la presencia del autoinductor, ya que no fue necesario añadirlo en los cultivos utilizados para las mediciones enzimáticas de la β -galactosidasa. Pero fue absolutamente dependiente de la presencia de *rhIR*, ya que sin la adición de IPTG no se detectó actividad enzimática en todos los cultivos probados.

Los datos obtenidos en los experimentos anteriores, confirman la funcionalidad del promotor tipo sigma 54, y la dependencia de *rhIR* de la fusión transcripcional pRD58-2. Pero también muestran la presencia de otro promotor independiente de sigma 54, capaz de inducir la transcripción en condiciones de alta densidad celular, ya que en ambas mutantes sigma 54⁻ (*P. aeruginosa* ; *E. coli*) y *rhIR*⁻ no se inhibió totalmente su expresión, además de que ambas retuvieron la capacidad de responder a la densidad celular.

Dados éstos resultados, el siguiente paso para el análisis de la transcripción de *rhIR*, fue la construcción de otras fusiones transcripcionales que nos pudieran aportar más datos respecto a su regulación.

CONSTRUCCION DE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES QUE CONTIENEN LOS INICIOS DE TRANSCRIPCION 1,3 Y 4.

Para analizar la funcionalidad de los posibles sitios de inicio de transcripción: 1, 3 y 4 (inicios -206,-448 y -663 respectivamente), se procedió a diseñar fusiones transcripcionales

que contuvieran estos sitios fusionados al gen reportero *lacZ*.

La forma de obtener éstas fusiones transcripcionales, fue mediante la amplificación de éstas regiones genéticas, con oligos cuya característica común fue el diseño de un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *EcoRI* (GAATTC) hacia el extremo 5' (oligos *rhIR*+1, *rhIR*+3, *rhIR*+4), y el oligo reverso *revrhIR* (figura 16), utilizando como templado la construcción pUO58.

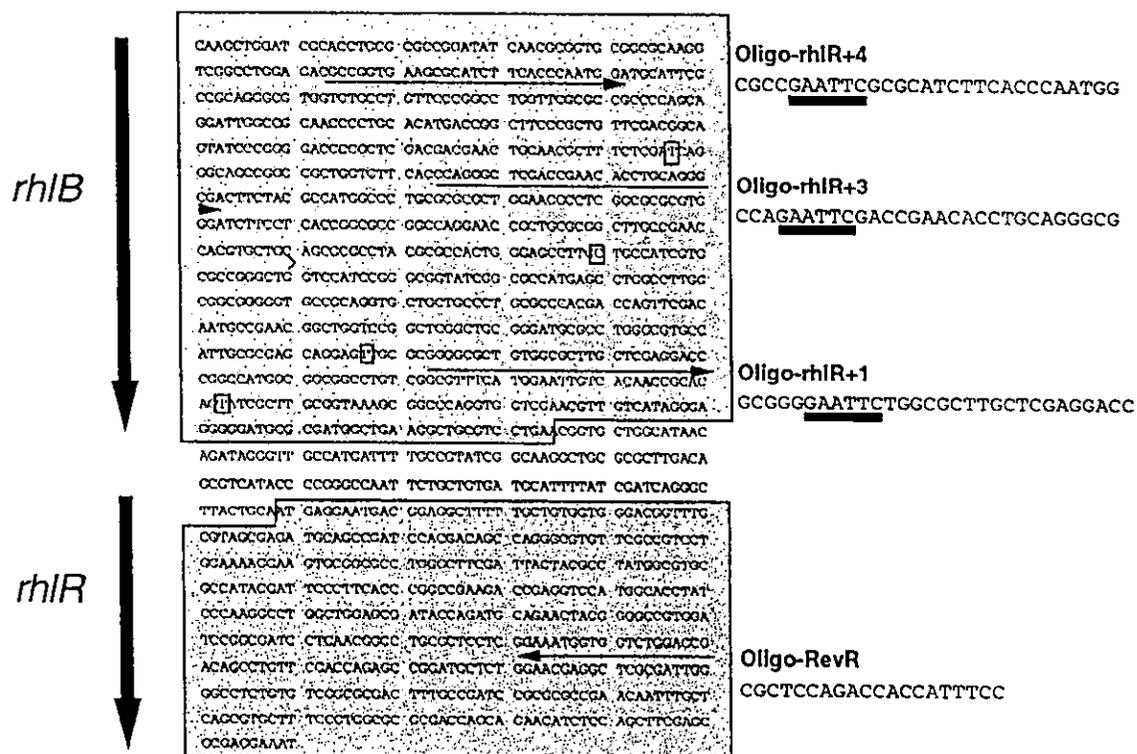


Figura 16.- Localización de los oligos utilizados para la amplificación de las regiones promotoras de *rhIR*. Las flechas indican el sitio en el cual se diseñaron los primers para la amplificación. Las partes subrayadas en los oligos indican su modificación para obtener sitios de restricción *EcoRI*.

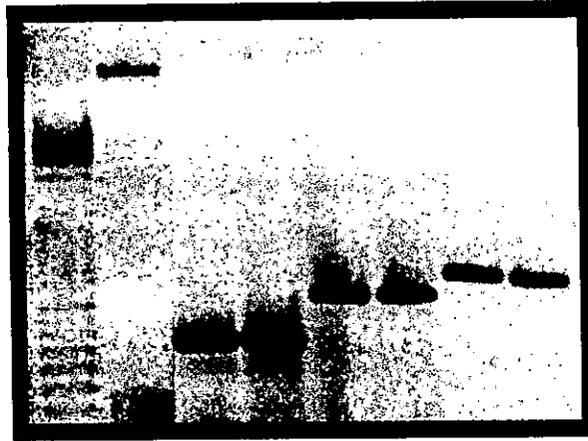


Figura 17.-Muestra la amplificación de las regiones promotoras de *rh1R* utilizadas para construir las fusiones transcripcionales pRD58-1, pRD58-3 y pRD58-4.

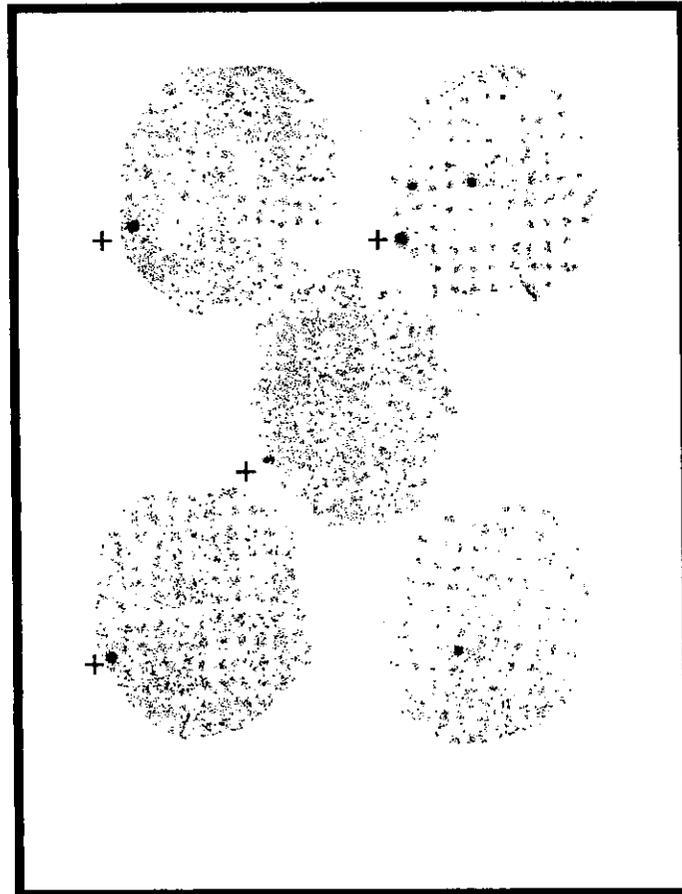


Figura 18.-Hibridación en colonia. selección de clonas positivas a la clonación de los productos de PCR, se utilizó como sonda una región intragénica de *rh1R* digerida con las enzimas de restricción BamHI-BglII.

Se obtuvieron 3 productos de PCR (de 580, 926 y 1126 pb) (figura 17), estos productos fueron posteriormente digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI (generando fragmentos de 520, 870 y 1080 pb), y posteriormente se clonaron en el vector pMP220. Las recombinantes fueron buscadas por hibridación en colonia utilizando como sonda los mismos productos de PCR (figura 18). Las fusiones transcripcionales resultantes fueron denominadas pRD58-1, pRD58-3 y pRD58-4 respectivamente (figura 19).

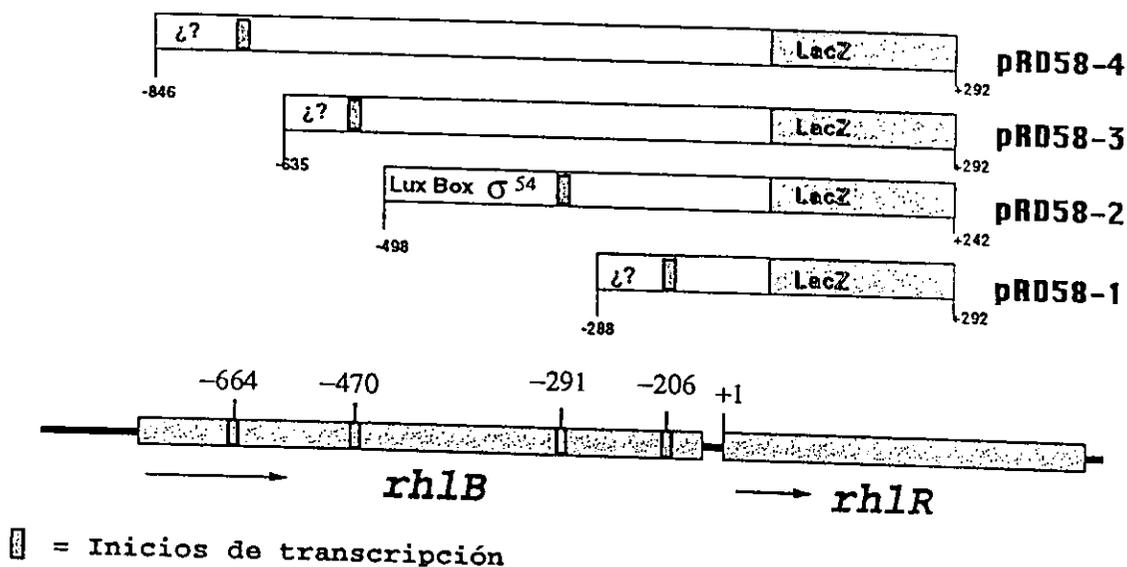
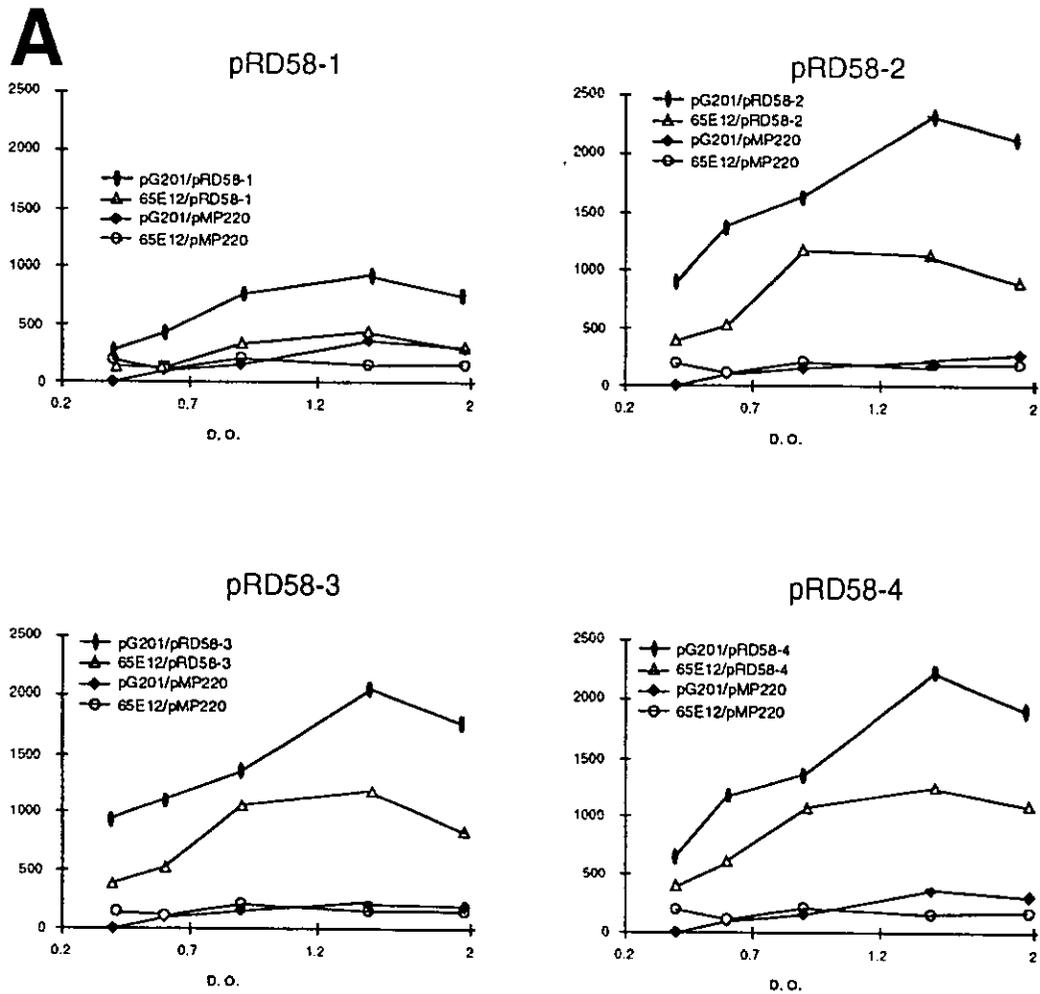


Figura 19.- Muestra los tamaños y ubicación de las fusiones transcripcionales obtenidas.

ANÁLISIS DE FUSIONES TRANSCRIPCIONALES QUE CONTIENEN LOS INICIOS DE TRANSCRIPCIÓN 1,3 Y 4

Para el análisis de las fusiones transcripcionales pRD58-1, pRD58-3 y pRD58-4., éstas fueron introducidas por conjugación a la cepa silvestre de *P.aeruginosa* PG201 y la mutante *rhlR*⁻ (65E12) Los datos de éste análisis se muestran en la (figura 20).



B

| | PG201 | 65E12 (rhIR ⁻) | |
|---------|---------|----------------------------|-----------------------|
| pRD58-1 | 800±50 | 300±30 | DO ₆₀₀ 1.4 |
| pRD58-2 | 2300±60 | 1030±49 | |
| pRD58-3 | 2150±45 | 1050±60 | |
| pRD58-4 | 2250±80 | 1150±48 | |

Figura 20.-A) Muestra la expresión de las fusiones transcripcionales pRD58-1, pRD58-2, pRD58-3 y pRD58-4 en diferentes etapas de crecimiento, expresada en unidades de B-gal/mg de proteína. B) Muestra los niveles de expresión de las fusiones transcripcionales pRD58-1, pRD58-2, pRD58-3 y pRD58-4, en el fondo genético de *P. aeruginosa* crecida a densidad celular DO₆₀₀ nm 1.4.

Las fusiones transcripcionales pRD58-3 y pRD58-4 mostraron los mismos niveles de induccion que la fusion transcripcional pRD58-2, este dato sugiere los supuestos inicios de transcripcion tres y cuatro (-448 y -663) son en realidad artefactos del método de "primer extension".

Por otro lado, en la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PG201 la expresion de la fusion pRD58-1 disminuyo en menos de un un 50% la expresion con respecto a la fusion pRD58-2, pero aún retuvo la capacidad de responder a la densidad celular. Por otra parte, en la mutante *rhIR-*, solo se expresaron niveles basales de la fusion transcripcional pRD58-1 y se perdió la capacidad de responder a la densidad celular. Este dato muestra que el inicio de transcripcion depende la proteina RhIR. Estos resultados y el análisis de la secuencia localizada arriba del inicio de transcripcion -206 (inicio 1), nos llevaron a la identificacion de un sitio concenso para el pegado del factor RpoS (figura 21) localizado en la region -219.

| Gen | Secuencia | Referencia |
|------------------|---|------------|
| <i>osmY</i> | TATC CCGAGC GTTTCAAAATTGTGATC TATATT TAACAAA | 64 |
| <i>osmB</i> (P1) | TCAT CCGCTC TAAGATGATTCCTGGTT GATAAT TAAGA | 30 |
| <i>fic</i> | CTCT CCGGCG TAACCCGATTTCGGCT TATACT TGTGG | 58 |
| <i>proP</i> (P2) | TTAA CCGGAG GGTGTAAGCAAACCCGC TACGCT TGTTACA | 11, 45 |
| <i>aldB</i> | ACTG GCGAAG ATTCGCCAGTCACGTC TACCCT TGTTATA | 62 |
| <i>bolA</i> (P1) | TAAG CTGCAA TGGAAACGGTAAAAGCG CCTACT ATTTA | 1, 35 |
| <i>xthA</i> | CAGG CCGTAA GCAACGGAAATCTGC TACCAT CCACGCA | 50 |
| <i>glgS</i> (P2) | ATTT ACGCAC GTTATGTTTAAAGGCAC TACACT GATTGGGG | 23 |
| <i>rhIR</i> | ATGG CCGCGG CCTGTGGCGTTTCATGG AATTCT CACAA | |

Figura 21.-Muestra un alineamiento de regiones concenso para el pegado del Factor sigma de fase estacionaria RpoS.

CONCLUSIONES

Los experimentos realizados anteriormente (72,73), indicaban que la activación transcripcional de *rhIR* se encontraba bajo el control jerárquico regulatorio del sistema "quorum sensing" *lasR - lasI*, sin embargo los experimentos tipo "Northen" realizados por Pearson *et al* (1997) (15), sugerían que parte de la expresión transcripcional de *rhIR* se daba por mecanismos diferentes al control transcripcional de sistema *las*.

RhIR es una proteína clave para la expresión de genes de virulencia en *P. aeruginosa* y además es un activador del factor sigma de fase estacionaria (RpoS). Se pudo comprobar que *rhIR* posee un mecanismo complejo de regulación, ya que su transcripción depende de la densidad de población ("quorum sensing", controlado via caja *lux*), las condiciones de estres propias de la fase de crecimiento estacionario (controlado via RpoS) y el factor transcripcional sigma 54, un factor transcripcional muy versatil involucrado en diversos procesos metabólicos (201,202,205,15), entre estos, la expresión de proteínas de resistencia a limitación de nutrientes (203,204).

El rearrreglo genético particular de la región promotora de *rhIR* es poco usual; sin embargo se pudo encontrar un caso similar en los operones *kdpABCDE* de *E. coli*, donde KdpD y KdpE son proteínas reguladoras de la familia de los dos componentes. En este operon se pueden formar tres transcritos *kdpABCDE*, *kdpABC* y *kdpDE*. El transcrito de *kdpDE* empieza dentro de la región codificante para *kdpC*. La implicación de la ubicación de la región promotora de *rhIR*, podría ser de tipo regulatorio.

Aun falta definir más finamente el sistema de transcripción de *rhIR*, como el caso de la caja *lux* localizada en su zona

promotora, sabemos ahora por los resultados de este trabajo y resultados recientes en nuestro laboratorio, que la proteína RhlR tiene afinidad por esta caja. Sin embargo aun desconocemos si unicamente la proteína RhlR se pega en esta región, ya que ademas podrían LasR y otra PhzR (otra proteína tipo luxR recientemente encontrado en nuestro laboratorio) podrían tener afinidad por el pegado a esta región.

Experimentos de retardación y de protección en la zona promotora de *rhlR* definida en este trabajo, ayudaran a esclarecer mas el mecanismo por el cual la bacteria sensa mediante este regulador transcripcional.

Referencias

- 1 -Doring, G., Maier, M., Muller, E., Bibi, Z., Tummler, B., Kharazmi, A. (1987) Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot. Chemother.* **39**,136-148.
- 2 -Nicas, TI., Iglewski, BH. (1985) The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol* Apr ;**31**(4):387-392
- 3 -Hodgkin, J. 1999 *Pseudomonas* pathogenicity.(1999) *Trends Genet* Apr;**15**(4):139
- 4 -Winson, M. K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chabra, S. R. Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G. P. C., Bycroft, B. W., Lazdunski, A., Stewart, G. S. A. B. & Williams, P. (1995) Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 9427-9431.
- 4a -Latifi, A., Winson, MK., Foglino, M., Bycroft, BW., Stewart, GS., Lazdunski, A., Williams, P. (1995) Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* **17**(2):333-43
- 5 -Fuqua, W. C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators *J. Bacteriol.* **172**, 269-275.
- 6 -Salmond, G. P. C., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. & Williams, P. (1995) The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication. *Mol. Microbiol.* **16**, 615-624.
- 13 -Passador, L., Cook, J.M., Gambello M.J., Rust, L., Iglewski B.H. (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**, 1127-1130.
- 14 -Brint, J. M., Ohman, D. E., (1995) Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.* **177** (24) 7155-7162.
- 15 -Pearson, J. P., Pesci, E. C., Iglewski B. H. (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.* **179** (18) 5756-5766.
- 16 -Fuqua, WC., Winans, SC., Greenberg, E.P. (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**(2):269-75
- 17 -Fuqua, C., Winans, SC., Greenberg, E.P. (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50** :727-51
- 18 -Rodelas, B., Lithgow, JK., Wisniewski-Dye, F., Hardman, A.,

- Wilkinson, A., Economou, A., Williams, P., Downie, J.A. (1999) Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *J Bacteriol* 181(12):3816-23
- 19 -Surette, MG., Miller, M.B., Bassler, B.L. (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 16;96(4):1639-44
- 20 -Lindum, PW., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S., Givskov, M. (1998) N-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MGL. *J Bacteriol* 180(23):6384-8
- 21 -Cha, C., Gao, P., Chen, YC., Shaw, PD., Farrand, S.K. (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 11(11):1119-29
- 22 -Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P.T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, GS., Bycroft, B.W., Pritchard D.I. (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* 66 (1): 36-42
- 23 -Puskas, A., Greenberg, E.P., Kaplan, S., Schaefer, A. L. (1997) A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 179 (23):7530-7
- 24 -Pesci, E.C., Iglewski, B.H. (1997) The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing. *Trends Microbiol* 5(4):132-4
- 24a -Fuqua, C., Greenberg, E.P. (1998) Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr Opin Microbiol* 1998 1 (2):183-189
- 25 -Parsek, MR., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E. Jr, Greenberg, E.P. (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 13;96(8):4360-5
- 26 -Eberhard, A. (1972) Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.* 109: 1101-1105.
- 27 -Nealson, KH., Hastings, J.W. (1979) Bacterial bioluminescence : its control and ecological significance. *Microbiol Rev* 43 (4):496-518.
- 28 -Nealson, K.H., Platt, T., Hastings, J.W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104 (1):313-22
- 29 -Eberhard, A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Nealson, K.H., Oppenheimer, N.J. (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20 (9):2444-9
- 30 -Kaplan, H.B., Greenberg, E.P. (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 163(3):1210-4
- 31 -Engbrecht, J., Nealson, K., Silverman, M. (1983) Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions

- from *Vibrio fischeri*. *Cell* 32 (3):773-81
- 32 -More, M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A., Winans, S.C. (1996) Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* 272 (5268):1655-8
- 33 -Schaefer, A.L., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E. Jr., Greenberg, E.P. (1996) Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (18):9505-9
- 34 -Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E. Jr., Greenberg, E.P. (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (8):4360-5
- 35 -Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., Iglewski, B.H. (1993) Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260 (5111):1127-30
- 36 -Parsek, M.R., Schaefer, A.L., Greenberg, E.P. (1997) Analysis of random and site-directed mutations in *rhIII*, a *Pseudomonas aeruginosa* gene encoding an acylhomoserine lactone synthase. *Mol Microbiol* 26 (2):301-10
- 37 -Schaefer, A.L., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E. Jr., Greenberg EP (1996) Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (18):9505-9
- 38 -Sitnikov, D.M., Schineller, J.B., Baldwin, T.O. (1995) Transcriptional regulation of bioluminescence genes from *Vibrio fischeri*. *Mol Microbiol* 17 (5):801-12
- 39 -Hanzelka, B.L., Stevens, A.M., Parsek, M.R., Crone, T.J., Greenberg, E.P. (1997) Mutational analysis of the *Vibrio fischeri* LuxI polypeptide: critical regions of an autoinducer synthase. *J Bacteriol* 179 (15):4882-7
- 40 -Choi, S.H., Greenberg, E.P. (1991) The C-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein contains an inducer-independent lux gene activating domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (24):11115-9
- 41 -Hanzelka, B.L., Greenberg, E.P. (1995) Evidence that the N-terminal region of the *Vibrio fischeri* LuxR protein constitutes an autoinducer-binding domain. *J Bacteriol* 177 (3):815-7
- 42 -Galinier, A., Garnerone, A.M., Reyrat, J.M., Kahn, D., Batut, J., Boistard, P. (1994) Phosphorylation of the *Rhizobium meliloti* FixJ protein induces its binding to a compound regulatory region at the *fixK* promoter. *J Biol Chem* 269 (38):23784-9
- 43 -Li, J., Kustu, S., Stewart, V (1994) In vitro interaction of nitrate-responsive regulatory protein NarL with DNA target sequences in the *fdnG*, *narG*, *narK* and *frdA* operon control regions of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol* 241 (2):150-65
- 44 -Darwin, A.J., Stewart, V. (1995) Nitrate and nitrite regulation of the Fnr-dependent *aeg-46.5* promoter of

- Escherichia coli* K-12 is mediated by competition between homologous response regulators (NarL and NarP) for a common DNA-binding site. *J Mol Biol* 251 (1):15-29
- 45 -Webber, C.A., Kadner, R.J. (1995) Action of receiver and activator modules of UhpA in transcriptional control of the *Escherichia coli* sugar phosphate transport system. *Mol Microbiol* 15 (5):883-93
- 46 -Da, R. S., Bertagnoli, S., Fourment, J., Reyrat, J.M., Kahn, D. (1994) Intramolecular signal transduction within the FixJ transcriptional activator: in vitro evidence for the inhibitory effect of the phosphorylatable regulatory domain. *Nucleic Acids Res* 22 (9):1555-61
- 47 -Choi, S.H., Greenberg, E.P. (1992) Genetic evidence for multimerization of LuxR, the transcriptional activator of *Vibrio fischeri* luminescence. *Molec. mar. Biol. Biotech.* 1 :408-413.
- 48 -Egland, K.A., Greenberg, E.P. (1999) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the luxI promoter. *Mol Microbiol* 1999 Feb;31(4):1197-204
- 49 -Lewenza, S., Conway, B., Greenberg, E.P., Sokol, P.A. (1999) Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. *J Bacteriol* 181 (3):748-56
- 50 -Stevens, AM., Greenberg, E.P. (1997) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J Bacteriol* 179 (2):557-62
- 51 -Beck von Bodman, S., Farrand, SK. (1995) Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. *J Bacteriol* 177 (17):5000-8
- 52 -Rust, L., Pesci, E.C., Iglewski, B.H. (1996) Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) regulatory region. *J Bacteriol* 178 (4):1134-40
- 53 -Devine, J.H., Shadel, G.S., Baldwin, T.O. (1989) Identification of the operator of the lux regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (15):5688-92
- 54 -Fuqua, C., Winans, S.C. (1996) Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J Bacteriol* 178 (2):435-40
- 55 -Gray, K.M., Passador, L., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P. (1994) Interchangeability and specificity of components from the quorum-sensing regulatory systems of *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176 (10):3076-80
- 56 -Gray, K.M., Passador, L., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P. (1994) Interchangeability and specificity of components from the quorum-sensing regulatory systems of *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176 (10):3076-80
- 57 -Fuqua, C., Winans, S.C. (1996) Localization of OccR-activated and TraR-activated promoters that express two ABC-type permeases and the traR gene of Ti plasmid pTiR10. *Mol Microbiol* 20 (6):1199-210
- 58 -Fuqua, C., Burbea, M., Winans, S.C. (1995) Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is

- inhibited by the product of the *traM* gene. *J. Bacteriol.* 177:1367-73
- 59 -Hwang, I., Cook, D.M., Farr, S.K. (1995) A new regulatory element modulates homoserine lactone-mediated autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer. *J. Bacteriol.* 177:449-58
- 60 -Engebrecht, J., Silverman, M. (1987) Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. *Nucl. Acids Res.* 15:10455-67
- 61 -Pirhonen, M., Flego, D., Heikinheimo, R., Palva, E.T. (1993) A small diffusible molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *EMBO J.* 12:2467-76
- 62 -Throup, J.P., Camara, M., Briggs, G.S., Winson, M.K., Chhabra, S.R., et al. (1995) Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersenia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol. Microbiol.* 17:345-56
- 63 -Winans, S.C. (1991) An *Agrobacterium* two-component regulatory system for the detection of chemicals released from plant wounds. *Mol. Microbiol.* 5:2345-50
- 64 -Ochsner, U.A., Reiser, J. (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6424-28
- 65 -Fuqua, W.C., Winans, S.C. 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* 176:2796-2806
- 66 -Hwang, I., Li P-L, Zhang, L., Piper, K.R., Cook, D.M., et al. (1994) *TraI*, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4639-43
- 67 -Eberhard, A., Widrig, C.A., McBath, P., Schineller, J.B. (1986) Analogs of the autoinducer of bioluminescence in *Vibrio fischeri*. *Arch. Microbiol.* 146:35-40
- 68 -Gambello, M.J., Iglewski, B.H. (1991) Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J. Bacteriol* 173(9):3000-9
- 69 -Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P. (1994) Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(1):197-201
- 70 -Gambello, M.J., Kaye, S., Iglewski, B.H. (1993) *LasR* of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun* 61(4):1180-4
- 71 -Toder, D.S., Gambello, M.J., Iglewski, B.H. (1991) *Pseudomonas aeruginosa LasA*: a second elastase under the transcriptional control of *lasR*. *Mol Microbiol* 5(8):2003-10
- 72 -Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., Lazdunski, A. (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in

- Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor rpoS. *Mol Microbiol* 21(6):1137-46
- 73 -Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., Iglewski, B.H. (1997) Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* 179 (10):3127-32
- 74 -Brint, J.M., Ohman DE (1995) Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family.
- 75 -Stead, P., Rudd, B.A., Bradshaw, H., Noble, D., Dawson, M.J. (1996) Induction of phenazine biosynthesis in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* by L-N-(3-oxohexanoyl)homoserine lactone. *FEMS Microbiol Lett* 140(1):15-22
- 76 -Hengge-Aronis, R. (1993) Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* 72(2):165-8
- 77 -Loewen, P.C., Hengge-Aronis, R. (1994) The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu Rev Microbiol* 48:53-80
- 78 -McLean, R.J., Whiteley M, Stickler DJ, Fuqua WC (1997) Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 154(2):259-63
- 79 -Albus AM, Pesci EC, Runyen-Janecky LJ, West SE, Iglewski BH (1997) Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179 (12):3928-35
- 80 -West, S.E., Sample, A.K., Runyen-Janecky, L.J. (1994) The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J Bacteriol* 176 (24):7532-42
- 81 -Reimann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., Haas, D. (1997) The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* 24 (2):309-19
- 82 -Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., Ausubel, F.M. (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 195 268(5219):1899-902
- 83 -Ochsner, U.A., Koch, A.K., Fiechter, A., Reiser, J. (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176(7):2044-54
- 84 -Brint, J.M., Ohman, D.E. (1995) Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* 177 (24):7155-63
- 85 -Chapon-Herve, V., Akrim, M., Latifi, A., Williams, P., Lazdunski, A., Bally, M. (1997) Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in

- Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 24(6):1169-78
- 86 -Glessner, A., Smith, R.S., Iglewski, B.H., Robinson, J.B. (1999) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of twitching motility. *J. Bacteriol.* 181 (5):1623- 1629
- 200 -Ochsner, U.A., Fiechter, A., Reiser, J. (1994) Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem* 269 (31):19787-95
- 201 -Merrick, M.J. (1993) In a class of its own--the RNA polymerase sigma factor sigma 54 (sigma N). *Mol Microbiol* 10 (5):903-9
- 202 -Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., Ramphal, R. (1997) A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J Bacteriol* 179 (17):5574-81
- 203 -Matin, A. (1996) Role of alternate sigma factors in starvation protein synthesis -novel mechanisms of catabolite repression. *Res Microbiol* 147(6-7):494-505
- 204 -Kim, Y., Watrud, L.S., Matin, A. (1995) A carbon starvation survival gene of *Pseudomonas putida* is regulated by sigma 54. *J Bacteriol* 177(7):1850-9
- 205 -Zielinski, N.A., Maharaj, R., Roychoudhury, S., Danganan, C.E., Hendrickson, W., Chakrabarty, A.M. (1992) Alginate synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* : environmental regulation of the *algC* promoter. *J Bacteriol* 174 (23):7680-8.