

00591

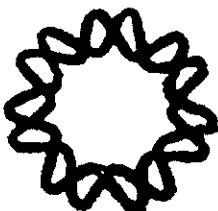


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

“BIOSINTESIS DE LA TDP-L-RAMNOSA Y SU
REGULACION GENETICA EN *Pseudomonas*
aeruginosa”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
P R E S E N T A :
BIOL. CLARITA OLVERA CARRANZA



275813

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO DE 2000



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Alicia González Manjarrez
Secretario: Dra. Gloria Soberón Chávez
Vocal: Dra. Alejandra Bravo de la Parra
Vocal Dr. Miguel Angel Cevallos
Vocal Dr. Guillermo Gosset Lagarda
Vocal Dr. Lorenzo Segovia
Suplente Dr. Mario Zurita

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, BAJO LA DIRECCION DE LA DRA.
GLORIA SOBERON CHAVEZ.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Gloria Soberón Chávez por la confianza depositada en mí en muchos aspectos, por los consejos y por la ayuda que siempre me ha brindado. Gracias Gloria.

A mis tutores: Dra. Alicia González Manjarrez, Dra. Guadalupe Espín Ocampo y Dr. José Luis Puente por su gran ayuda a mi formación académica y por su amistad.

A los miembros del jurado por el tiempo y esfuerzo brindado en la adecuada presentación de esta tesis.

A mis amigos Soberones: Naty, Leandro, Ross, Gerardo, Agustino, Rafael, Renato, Rebeca y Jesús por haberme soportado todos estos años.

A Naty, por haberme permitido ser su tutora de tesis de licenciatura.

A Ross y a Leandro por su gran ayuda técnica en el área de ramnolípidos y mutagénesis.

A mis amigos Espines: Miguel, Josefina, Daniel, Soledad y Cinthia

A Don Eduardo y Doña Mary por ser parte muy importante de todos los trabajos realizados en el laboratorio.

DEDICATORIA

A DIOS POR LO BUENO QUE HA SIDO CONMIGO Y POR LAS GRANDES ALEGRÍAS QUE ME HA DADO EN ESTA

A MI HIJO LUIS DAVID, GRACIAS POR HABER LLEGADO A DARLE LUZ A NUESTRA VIDA Y POR DARNOS EN CADA SONRISA UN RAZON MAS PARA SALIR ADELANTE.

A LUIS GERARDO POR DAR A MI VIDA ESE AMOR Y TRANQUILIDAD QUE TANTO NECESITABA.

GRACIAS MI AMOR POR ESTAR SIEMPRE A MI LADO.

A MI MADRE YOLANDA CARRANZA AVELDAÑO. GRACIAS MAMA POR HABER DADO TU VIDA PARA DARMÉ LA OPORTUNIDAD DE SER LO QUE SOY AHORA.

A MI ABUELO MANUEL CARRANZA MENDOZA POR HABER SEMBRADO EN CADA UNO DE SUS HIJOS ESA SEMILLA DE GRANDEZA QUE YA A FLORECIDO.

A MIS HERMANAS, POR ENSEÑARME QUE LA FELICIDAD SE ENCUENTRA DE DIFERENTES MANERAS.

A MI ABUELA Y A JAIME QUE AUNQUE YA NO ESTAN SIEMPRE ESTAN EN MIS PENSAMIENTOS

INDICE.....	1
ABSTRACT.....	3
RESUMEN.....	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
Ramnolípidos.....	7
dTDP-L-ramnosa.....	12
Vía biosintética.....	12
Genética de la biosíntesis.....	14
Regulación genética de la biosíntesis	15
Lipopolisacáridos	16
Alginato	18
“Quorum sensing”.....	21
“Quorum sensing” en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
Sistema LasR-LasI	25
Sistema RhIR-RhII	26
Factor sigma 38 (RpoS).....	26
OBJETIVOS	28
MATERIALES Y METODOS	29
Cepas bacterianas, plásmidos, medios y condiciones de cultivo.....	29
Manipulación del DNA	31
Amplificación de la región promotora de <i>rmlB</i> y construcción del plásmido pCLD28	31
Análisis de hibridación DNA-RNA en gota (“Dot blot”).....	32
Análisis de extensión de iniciadores.....	32
Actividad enzimática de dTDP-glucosa-4,6-deshidratasa.....	33
Determinación de ramnolípidos	33
Amplificación del gen <i>rpōS</i> y construcción del plásmido pCOC2.....	34

RESULTADOS Y DISCUCIONES	34
Artículo: The <i>Pseudomonas aeruginosa algC</i> gene product participates in rhamnolipid biosynthesis.....	35
Caracterización de los genes <i>rml</i> involucrados en la síntesis de la TDP-L-ramnosa	41
Análisis transcripcional del operón <i>rml</i>	45
La transcripción del operón <i>rml</i> aumenta según la fase de crecimiento.....	47
La síntesis de la TDP-L-ramnosa depende del sistema “quorum sensing” RhlR.....	50
El factor sigma S no interviene en la transcripción del operón <i>rml</i>	51
Modelo de regulación del operón <i>rml</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
CONCLUSIONES	54
PERSPECTIVAS	55
REFERENCIAS	56

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa produces rhamnose-containing glycolipid biosurfactants which have several industrial and environmental applications. The biosynthesis of these tenso-active molecules proceeds by two sequential rhamnosyl-transfer reactions, each catalyzed by specific rhamnosyltransferase with deoxythymidine-diphospho-L-rhamnose (dTDP-L-rhamnose) acting as rhamnosyl donor in both reactions and β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate or monorhamnolipid acting as the respective recipients. *Pseudomonas aeruginosa* uses dTDP-L-rhamnose in both lipopolysaccharide-O antigen and rhamnolipid production. Evidence is presented here showing that the product of the *algC* gene (which is involved in alg production through its phosphomannomutase activity and in LPS synthesis through its phosphoglucomutase activity) participates in rhamnolipids production, presumably catalyzing the first step in the dTDP-L-rhamnose pathway, i. e. the conversion of glucose-6-phosphate to glucose-1-phosphate. We also show that other structural *alg* genes, encoded in the *alg* operon, are not involved in rhamnolipids nor LPS production. These results show that the AlgC protein plays a central role in the production of the three *P. aeruginosa* virulence-associated saccharides: alginate, LPS and rhamnolipids. Further, the synthesis of activated rhamnose from glucose 6-phosphate is achieved by the products of the *rmlBCAD* genes, which encode the enzymes glucose-1-phosphate transferase, dTDP-glucose-4,6-dehydratase, dTDP-4-keto-L-rhamnose-3,5-epimerase and dTDP-L-rhamnose synthase, respectively. Here we report the isolation, characterization and regulation of the operon *rmlBCAD*, which is involved in dTDP-L-rhamnose biosynthesis. These genes were identified in the *Pseudomonas aeruginosa* genome project and isolated by hybridization using as probe a part of the *rmlB* gene isolated by PCR. Upstream of the *rmlB* gene we found a sigma 70 and sigma S dependent promoter. We show that these genes are expressed at a basal level in the exponential phase of growth and that, whenever RhIR is

expressed, their expression level is highly increased in the stationary phase of growth. We report that an *rhlR* mutant shows no activity of the RmlB enzyme and their expression level and activity is decreased in the *rpoS* mutant. These data suggest that RhlR affects dTDP-L-rhamnose production through its influence on expression.

RESUMEN

La dTDP-L-ramnosa en *Pseudomonas aeruginosa* es un precursor tanto de la biosíntesis de antígeno O de los LPS de pared celular (el cual esta asociado a la patogenicidad), así como en la producción del biosurfactante ramnolípido el cual tiene un gran potencial para su uso en la industria química, agrícola, de limpieza ambiental, etc. Se ha determinado que este precursor es limitante para el aumento en la producción de este biosurfactante. Debido a esto, el objetivo de este trabajo es el estudio de la biosíntesis de la TDP-L-ramnosa, así como la regulación de los genes biosintéticos (*rml*). La síntesis de TDP-L-ramnosa se lleva a cabo mediante la conversión de glucosa-6-fosfato a TDP-L-ramnosa, esta biosíntesis puede ser dividida en cinco reacciones. Primero una fosfoglucomutasa (*AlgC*) hace la conversión de glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato, después la glucosa-1-fosfato timidililtransferasa (*RfbA*) une un TTP a la molécula de D-glucosa-1-fosfato liberando un pirofosfato y formando la dTDP-D-glucosa la dTDP-D-glucosa-4,6-deshidratasa (*RfbB*) lo transforma a dTDP-4-ceto-6-desoxi-D-glucosa la cual es epimerizada en el carbón tres y cinco por la dTDP-6-desoxi-D-glucosa-3,5-epimerasa (*RfbC*). El paso final es la reducción acoplada con NADPH para formar la dTDP-L-ramnosa catalizada por la dTDP-6-desoxi-L-manosa deshidrogenasa (*RfbD*). Mostramos evidencia de que el producto del gen *algC* participa en la síntesis de ramnolípidos probablemente actuando como la fosfoglucomutasa que interviene en la síntesis de TDP-L-ramnosa y demostramos que ningún otro gen *alg* participa en la síntesis de ramnolípidos y de los LPS. Por otro lado, identificamos los genes *rml* que participan en los últimos cuatro pasos de la síntesis de la TDP-L-ramnosa. Esto se llevo a cabo mediante el análisis con el banco de datos genómico de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Se clonó un fragmento de 6.3Kb que lleva los cuatro genes biosintéticos *rmlABCD*, se determinó que estos genes están organizados en un operón

y se identificó su region promotora. Mediante análisis de “Dot blot” se observó que estos genes son transcritos a nivel basal en fase exponencial y que al pasar a fase estacionaria la transcripción de estos genes se aumenta aproximadamente 4 veces. Así mismo, se observó que los RNAm de *rhlR* y *rpoS* también aparecen en la fase estacionaria de crecimiento. Estos datos aunados a la falta de actividad enzimática en una mutante en el gen *rhlR* (el cual regula positivamente la transcripción de *rpoS*) y a una disminución en la actividad enzimática y en el nivel del transcrito en la mutante *rpoS*, nos sugieren que estos genes están regulados por el sistema *rhl* de *Quorum sensing*.

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa; ubicua y altamente exitosa, presente en una gran diversidad de habitats incluyendo suelo, rizosfera, agua dulce y ambientes marinos. Este microorganismo es un patógeno oportunista de humanos causando infecciones en pacientes inmunocomprometidos como enfermos de quemaduras, cáncer, SIDA, y fibrosis quística, además se ha demostrado que *P.aeruginosa* también infecta plantas e insectos. El éxito de *P. aeruginosa* se debe a un impresionante arsenal de factores de virulencia que incluyen múltiples compuestos asociados a la célula tales como alginato, pili y lipopolisacárido, así como productos secretados tales como exotoxina A, exoenzima S, piocianina, elastasa, proteasa Las A, proteasa alcalina, fosfolipasas y ramnolípidos. (Costerton, *et al*, 1980)

Ramnolípidos

El biosurfactante ramnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los biodetergentes más estudiados, consta de una cabeza polar iónica constituida de una o dos moléculas de ramnosa y una cola hidrofóbica compuesta de uno o dos β -hidroxiácidos (Fig. 1) (Rendell *et al*; 1990). Se ha propuesto la aplicación de estos biosurfactantes en la remoción de contaminantes como metales e hidrocarburos de agua y suelos contaminados, así como en el control biológico de algunas especies fitopatógenas como *Phytophthora capsici* y *Pythium aphanidermatum*. (Raina Miller,*et al*. 1992)

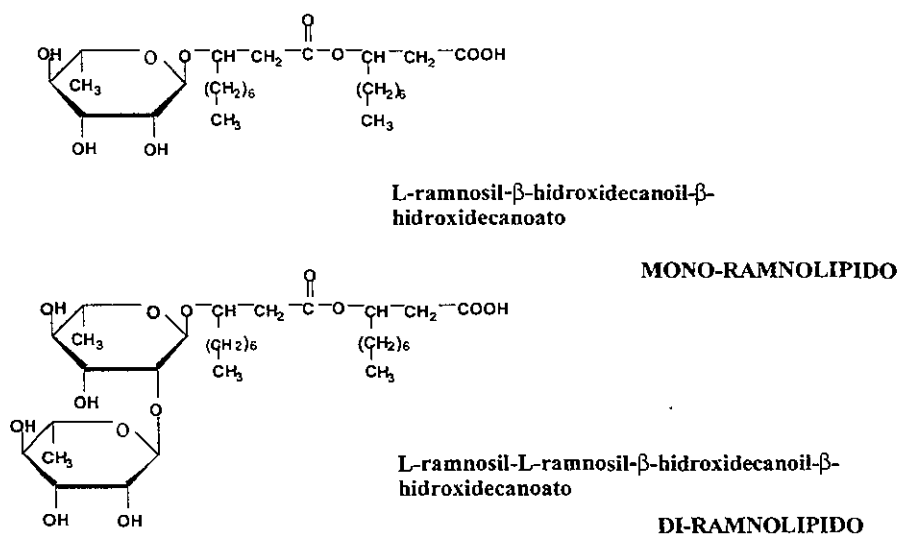


Figura 1. Estructura química de los principales ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*.

Los ramnolípidos fueron reportados por primera vez por Jarvis *et al.*, en 1949, el estudio de la biosíntesis de estos compuestos *in vitro* fué descrita por Hauser y Karnovsky, 1954, 1957 y 1958, quienes además demostraron que estos glicolípidos son secretados al medio durante la fase estacionaria de crecimiento. Burger *et al.*, 1963 y 1966, describieron la síntesis enzimática completa de los ramnolípidos utilizando extractos celulares de *P. aeruginosa* y demostraron que la síntesis procede por transferencias secuenciales de un grupo ramnosil; donado por la timidin difosforamnososa (TDP-ramnososa); a una molécula de β-hidroxiácidos, esta reacción es catalizada por la enzima ramnosiltransferasa I. Rendell *et al.*, 1990 caracterizaron los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa*, siendo los principales: el L-ramnosil-β-hydroxidecanoil-β-hydroxidecanoato (mono-ramnolípidido) y el L-ramnosil-L-ramnosil-β-hydroxidecanoil-β-hydroxidecanoato (di-ramnolípidido) (Fig. 2), adicionalmente,

existen ramnolipidos de diferentes cadenas de β -hidroxiácidos (C_8 - C_{12}) lo que indica que la enzima ramnosiltransferasa no es específica para el β -hidroxi-decanoil- β -hidroxi-decanoato.

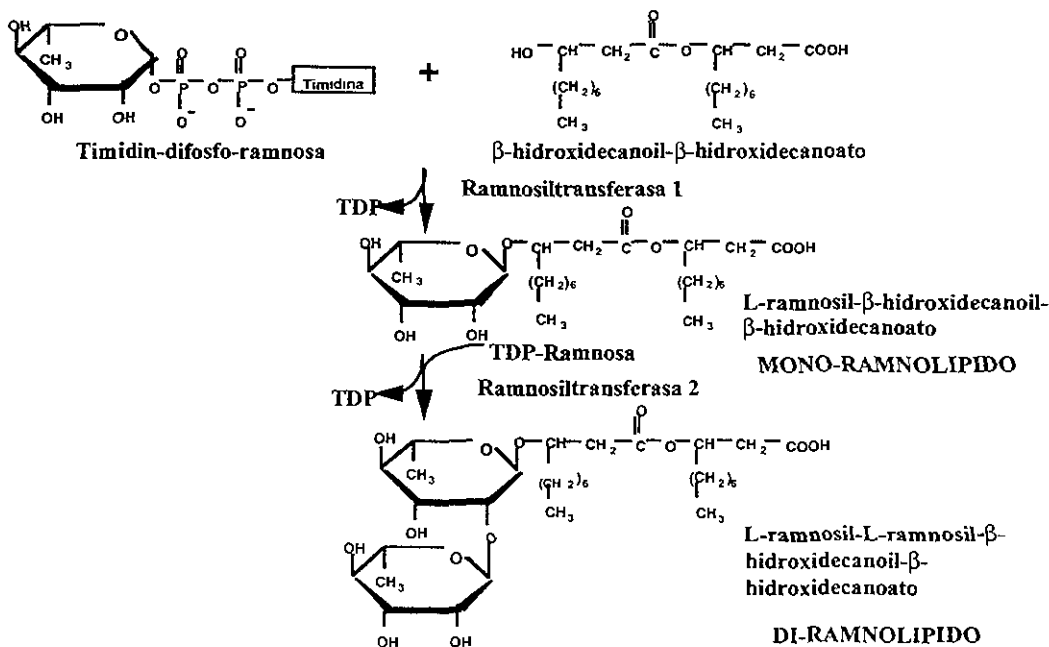


Figura 2. Biosíntesis de los ramnolipidos en *Pseudomonas aeruginosa*.

Ochsner *et al.*, (1994), aislaron y caracterizaron los genes *rhlABRI* involucrados en la biosíntesis de ramnolipidos de *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 3), ellos proponen que el complejo enzimático RhlAB se encuentra localizado entre la membrana y el periplasma, y que la proteína RhlB es la responsable de la actividad catalítica. El sistema regulador de la biosíntesis (Fig. 3) está constituido por una proteína reguladora RhlR que se activa por la unión de un autoinductor (butanoil homoserina lactona), el cual se produce por la enzima RhlI llamada sintetasa del

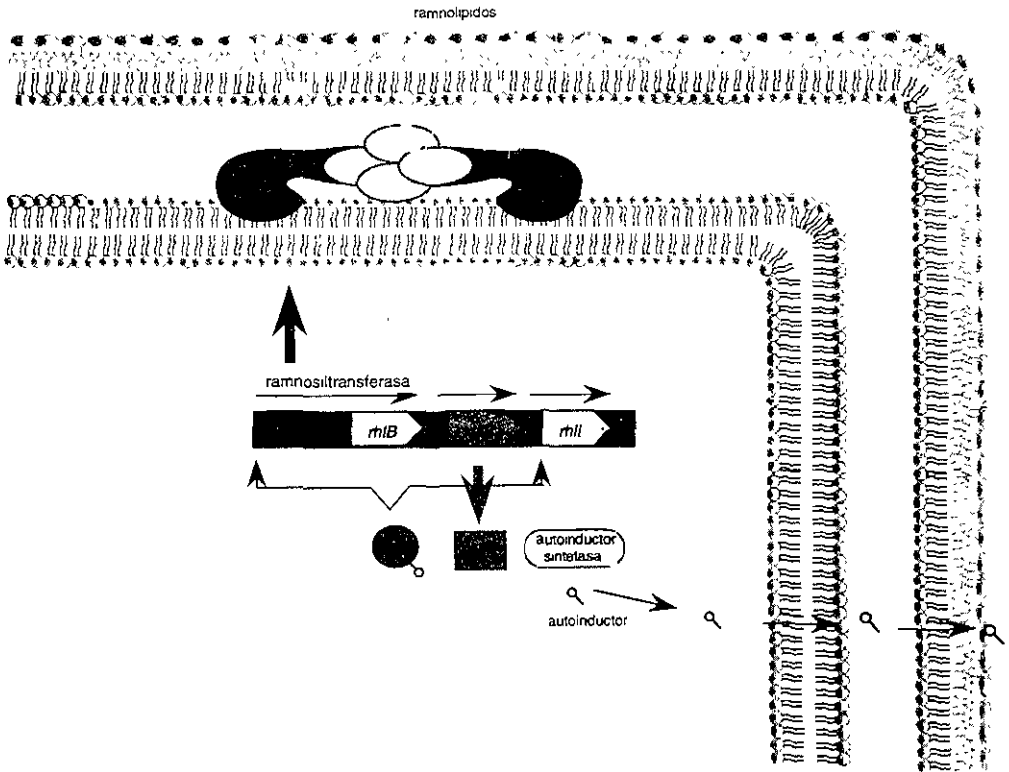


Figura 3. Regulación de los genes biosintéticos de ramnolípidos en *Pseudomonas aeruginosa* mediante el sistema "quorum sensing" RhIR

autoinductor. El regulador positivo RhIR activado por la unión del autoinductor, promueve la expresión de los genes *rhlAB* que están organizados en un operón, y del gen *rhlI*. Los genes *rhlAB* codifican para la ramnosiltransferasa I, mientras que el gen *rhlR* codifica para la proteína reguladora y el gen *rhlI* codifica para la sintetasa del autoinductor, Estos últimos dos genes se transcriben a partir de su propio promotor, mientras que *rhlA* y *rhlB* forman un operón (Ochsner *et al*, 1995).

Posteriormente, Ochsner *et al.*, 1995, reportan la expresión de los genes *rhlAB* bajo el promotor *tac* en *E.coli*, pero a pesar de que detectan actividad de ramnosiltransferasa en los extractos celulares no observan la producción de ramnolípido. Proponen que la capacidad de producir ramnolípidos depende de la disponibilidad de los sustratos precursores, timidin difosfo-ramnosa (TDP-ramnosa) y el β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, y que las concentración intracelular de estos precursores son limitantes en *E. coli* pero no en *P. aeruginosa*. Los precursores del ácido graso 3-hidroxidecanoil están presentes en *E. coli* como intermediarios de la vía biosintética de ácidos grasos insaturados de cadena larga (Magnuson K. *et al*, 1993). El sustrato donador, TDP-ramnosa se encuentra en una gran variedad de bacterias. Se ha demostrado que *E. coli* es capaz de producirlo, sin embargo, la capacidad de formar TDP-ramnosa es cuatro veces menor en extractos celulares crudos de *E. coli* que en los de *P. aeruginosa* (Glaser L. and S. Kornfeld., 1961).

Los análisis realizados en nuestro laboratorio utilizando una *E.coli* que lleva los plásmidos pUO98 o pUO94 (*rhlAB* y *rhlABR* bajo el promotor *tac* respectivamente) creciendo en medio de cultivo bajo en fosfatos y suplementado con ramnosa nos indican la presencia de biosurfactante ramnolípido. Estos resultados sugieren que el precursor limitante de la biosíntesis de ramnolípidos en *E.coli* es la TDP-ramnosa. Debido a esto, nosotros nos interesamos en la biosíntesis y regulación

de este precursor.

dTDP-L-ramnosa

Las desoxihexosas se encuentran como componentes estructurales de pared celular, en polisacáridos, lipopolisacáridos, glicoproteínas, glicolípidos, oligosacáridos y como intermediarios de algunas vías degradativas y biosintéticas en bacterias, plantas y animales. Los dos miembros más representativos de este grupo son la L-fucosa y la L-ramnosa. La L-ramnosa forma parte de muchos compuestos que tienen amplio potencial en la industria alimentaria, agrícola, ambiental y farmacéutica. El polisacárido “gellan” producido por *Pseudomonas elodea* está compuesto por L-ramnosa, L-manosa, D-glucosa y β -D-glucosamina. Se ha propuesto su utilización en la industria de alimentos como gelificante y espesante. Los ramnósidos compuestos que contienen ramnosa, son producidos por algunos microorganismos y plantas; actualmente son sintetizados químicamente utilizando como materia prima la L-ramnosa. Los miembros más conocidos de este grupo son el “quercetrin” que es utilizado como colorante en la industria textil y el “rutin” que es utilizado con fines terapéuticos como protector capilar. (Glaser, Luis., 1963)

Vía Biosintética

La síntesis de TDP-L-ramnosa (Fig. 4) se lleva a cabo mediante la conversión de TDP-D-glucosa a TDP-L-ramnosa (Marumo K. *et al*, 1992), en cuatro reacciones: primero, la glucosa-1-fosfato timidililtransferasa (RfbA) une un TTP a la molécula de D-glucosa-1-fosfato liberando un pirofosfato y formando la dTDP-D-glucosa. Segundo, la dTDP-D-glucosa se deshidrata por la dTDP-D-glucosa-4,6-deshidratasa (RfbB) para formar dTDP-4-ceto-6-desoxi-D-glucosa la cual es epimerizada en el

carbón tres y cinco por la dTDP-6-desoxi-D-glucosa-3,5-epimerasa (RfbC). El paso final es la reducción acoplada con NADPH para formar la dTDP-L-ramnosa catalizada por la dTDP-6-desoxi-L-manosa deshidrogenasa (RfbD) (Zhang *et al.*, 1993).

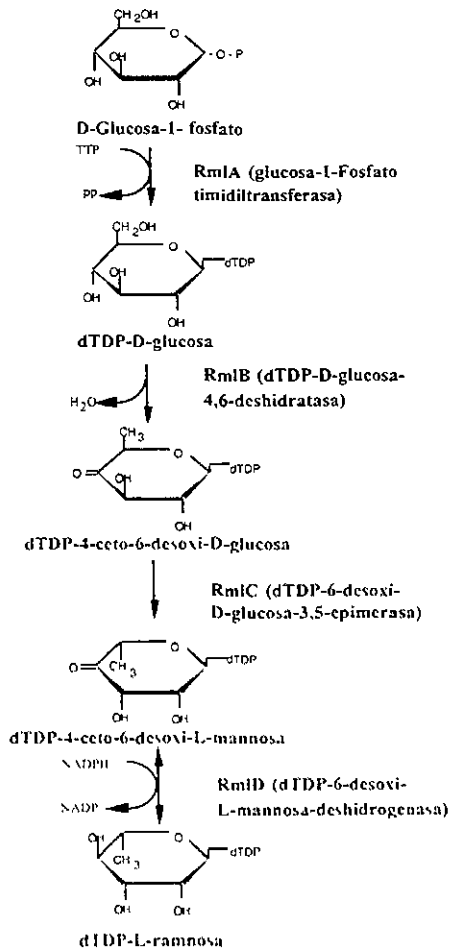


Figura 4. Vía de biosíntesis de la dTDP-L-ramnosa

Genética de la Biosíntesis de TDP-L-Ramnosa

El aislamiento de los genes *rfb BDAC* para la síntesis de TDP-L-ramnosa de *Salmonella typhimurium* lo llevó a cabo Jiang *et al.*, (1991). Ellos realizaron los análisis enzimáticos de los productos de estos genes y determinaron que el gen *rfbA* codifica para la dTDP-D-glucosa timidililtransferasa, que el gen *rfbB* codifica para la dTDP-D-glucosa-4,6-deshidratasa, que el gen *rfbC* codifica para la dTDP-6-desoxi-D-glucosa-3,5-epimerasa y que la dTDP-6-desoxi-L-manosa deshidrogenasa está codificados por el gen *rfbD*. Encontraron dos secuencias promotoras en el extremo 5' del gen *rfbB* que encabeza el grupo de genes, lo que sugiere que se encuentran organizados en un operón. Se han sobreexpresado los genes *rfbBDAC* de *Salmonella typhimurium* en *E. coli* bajo el promotor T7 y se han obtenido entre 5-20 mg de L-ramnosa de extractos celulares (Marumo *et al.*, 1992). Los genes *rfbBDAC* de *E. coli* VW187 se han caracterizado y se ha determinado que se encuentran organizados en un operón, y que presentan entre un 60 al 92% de identidad con los genes de *S. typhimurium*. (Tabla 1) (Marolda *et al.*, 1995)

En *Xanthomonas campestris* (perteneciente a la misma familia que *Pseudomonas aeruginosa*) se encontró un fragmento de 3.9 Kb que lleva los genes de la síntesis de dTDP-L-ramnosa, estos presentan una identidad a nivel de aminoácidos de 38 al 67% con los genes de *S. typhimurium* (Tabla 1). No se encontró ninguna secuencia promotora consenso parecida a las de *E. coli*. Sin embargo, la complementación de mutantes de *E. coli* se logró, lo que indica que la expresión de los genes se llevó a cabo (Koplin *et al.*, 1993). También se han clonado y secuenciado los genes que codifican para la vía biosintética de dTDP-L-ramnosa de *Shigella*, (Klena and Schnaitman, 1993) *Yersinia* (Zhang *et al.*, 1993) y *Klebsiella* (Clarke *et al.*, 1992) en estos organismos los genes cambian su orden, no obstante permanecen

organizados en un solo operón. En *Azorhizobium* (Goethals *et al.*, 1994) y *Neisseria* (Robertson *et al.*, 1994) se encuentran como genes crípticos que debido a mecanismos de rearrreglos genéticos no son funcionales.

Tabla 1. Comparación de la identidad de los genes *rfb* de *Salmonella typhimurium* con otras bacterias.

Bacteria	<u>Gen</u>			
	<u><i>rfbA</i></u>	<u><i>rfbB</i></u>	<u><i>rfbD</i></u>	<u><i>rfbC</i></u>
<i>E. coli</i>	92%	76%	60%	73%
<i>X.campestris</i>	56%	57%	38%	67%

Regulación de la Biosíntesis de dTDP-L-Ramnosa

Los trabajos relacionados con la regulación de los genes *rfb* son de regulación postranscripcional. En *E.coli*, *Shigella flexneri* y en *Salmonella* se ha reportado que en la parte 3' del operón de los genes *rfb* se encuentra un gen denominado *rfbX* el cual se transcribe a partir del promotor del operón. Los primeros nucleótidos del gen *rfbX* junto con los últimos del gen *rfbD* forman una estructura secundaria la cual le da estabilidad al RNAm (Macpherson *et al.*;1995). Existe otra estructura secundaria que se forma justo al extremo 5' del operón *rfb*; que oculta el sitio de unión al ribosoma del RNAm (Macpherson *et al.*; 1994). En bacterias de bajo G+C, los genes *rfb* tienen un alto contenido de G+C por lo que se ha propuesto que en estos microorganismos el mecanismo de regulación de estos genes se lleva acabo por la

presencia de un alto número de codones raros (Macpherson *et al*; 1995). Se ha encontrado una secuencia de 39 pb conservada denominada JUMPstart (Just Upstream Many Polisaccharides-associated gen start) que tienen dos secuencias directas repetidas GGTAGC y una secuencia rica en G+C se propone que esta secuencia puede funcionar como un sitio de unión de un co-regulador de la transcripción o que esté involucrada en eventos de recombinación (Hobbes M. and Reeves; 1994).

Lipopolisacáridos

La TDP-ramnosa es precursor en la biosíntesis de algunos constituyentes celulares y metabolitos secundarios, en *P. aeruginosa* participa en la síntesis del lipopolisacárido de pared, el cual se produce en diversas bacterias gram negativas. Los lipopolisacáridos constituyen la mayor parte de la membrana externa de las bacterias gram negativas. Los lipopolisacáridos son moléculas que consisten de un complejo heteropolisacárido fosforilado que está covalentemente ligado a una molécula de lípido A que contiene glucosamina. La porción de polisacáridos se ha dividido en dos regiones mayoritarias una región interna “core” y una periférica denominada antígeno O (Paul D. Rick, 1996). La región “core” está dividida en “core” interno constituida de ácido 3-desoxi-D-octulosónico y L-glicerol-D-manoheptosa. El core externo tiene como constituyentes; a la glucosa, a la ramnosa, a la galactosamina y a la alanina.

El antígeno O del lipopolisacárido (también denominado banda B) en *Pseudomonas aeruginosa* está formado en ciertos serotipos, por L-ramnosa además de otros amino azúcares inusuales. El antígeno O tienen gran importancia ya que participa en el reconocimiento intracelular y la resistencia a la lisis celular de

bacterias patógenicas por lo que es utilizado para identificación de cepas y como vacuna. (Dasgupta *et al*,1994).

Otro antígeno presente en *P. aeruginosa* (Fig. 5) utilizado para la serotipificación es el llamado antígeno común o banda A que se compone de un homopolímero de D-ramnosa. La ramnosa en el antígeno común tiene configuración D mientras que la ramnosa que se encuentra en el antígeno O tiene configuración L. Es interesante que el antígeno O de muchas *Pseudomonas* fitopatógenas, tales como *Pseudomonas syringae* también contienen D-ramnosa como principal componente y algunas de ellas poseen una estructura similar a la del antígeno común de *Pseudomonas aeruginosa*. (Yuriy Knirel, 1990).

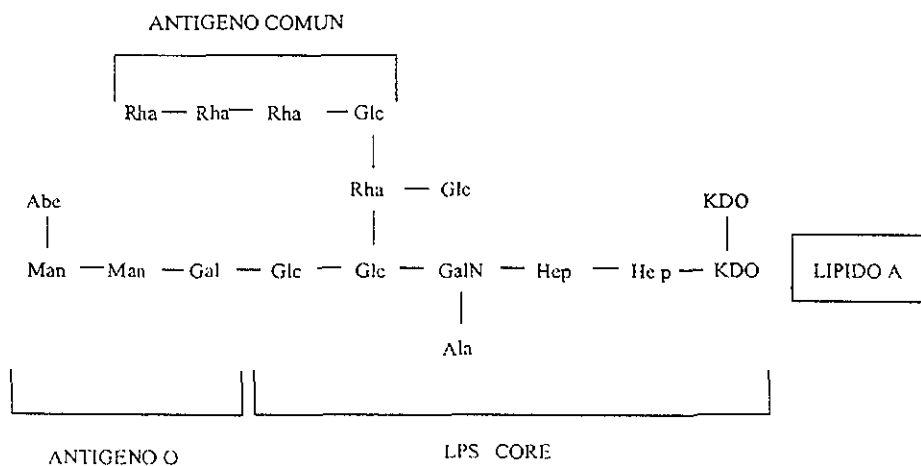


Figura 5. Estructura del lipopolisacárido de pared de *Pseudomonas aeruginosa*.

La síntesis del antígeno O y de la región "core" del lipopolisacárido ocurre por diferentes mecanismos. La elongación de la región "core" se lleva a cabo a través de

transferencias secuenciales de monosacáridos a partir de nucleótidos donadores de azúcares al final de la cadena creciente de polisacáridos no reducido. En contraste, el antígeno O se ensambla independientemente como un polímero unido al lípido y subsecuentemente transferido a la glucosa no reducida del core completo.

Los genes para la biosíntesis de la banda A y banda B de los LPS de *Pseudomonas aeruginosa* serotipo O5 se han clonado. Los que corresponden a la banda A se encuentran en el minuto 11-13 y los de la banda B en el minuto 37 del cromosoma de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Burrows, *et al*; en 1996 reportan la caracterización molecular de dieciseis genes involucrados en la síntesis de la banda B o antígeno O entre los que se incluyen los genes de la biosíntesis de N-acetil fucosamina y del ácido 2-acetoamido-3-acetamidino-2,3-didesoxi-D-manurónico; tres glicosiltransferasas; dos polimerasas y un posible gen de transporte. La caracterización de los genes de la banda A esta en proceso (Rochetta, *et al*; 1999).

Alginato

El alginato es un exopolisacárido producido por *Pseudomonas aeruginosa* durante infecciones en los pulmones de los pacientes con fibrosis quística (Darzins and Chakrabarty, 1984), es un polímero lineal compuesto de residuos de ácido β -D-manurónico O-acetilados (M) y de su epímero (C5) el ácido α -L-gulurónico (G), unidos por enlaces β -(1-4). Los residuos M y G están organizados en bloques a lo largo de la cadena de alginato formando regiones homo y heteropoliméricas, mientras que la primera tiene bloques M, la última está compuesta de ambos monómeros arreglados en secuencias alternadas, compuesto de dímeros MG y residuos GMM y MMG. El alginato en presencia de cationes divalentes como Ca^{+2} , experimenta un cambio conformacional lo que resulta en la formación de un gel

debido a la dimerización y agregación de las cadenas de alginato (Clementi, 1998).

La ruta biosintética del alginato (Fig. 6) se lleva acabo a partir de la fructosa 6-fosfato; que se convierte a través de cuatro reacciones enzimáticas en ácido GDP-manurónico el cual es el sustrato de polimerización. El ácido polimanurónico resultante se excreta y se modifica por una O-acetilasa y una C-5 epimerasa extracelulares para dar el producto final alginato. La genética molecular de la biosíntesis de alginato se ha estudiado ampliamente (Deretic et al, 1994; May y Chakrabarty, 1994).

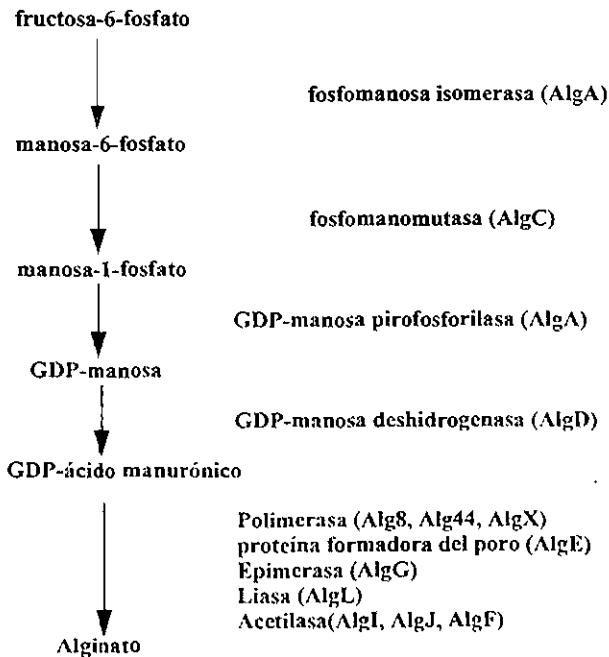


Figura 6. Ruta biosintética del alginato en *Pseudomonas aeruginosa*.

Los genes biosintéticos se encuentran agrupados en una sola región del cromosoma; organizados en un operón polisistémico; excepto *algC*. (Fig. 7) (Lloret *et al*, 1996; Nuñez, 1998).

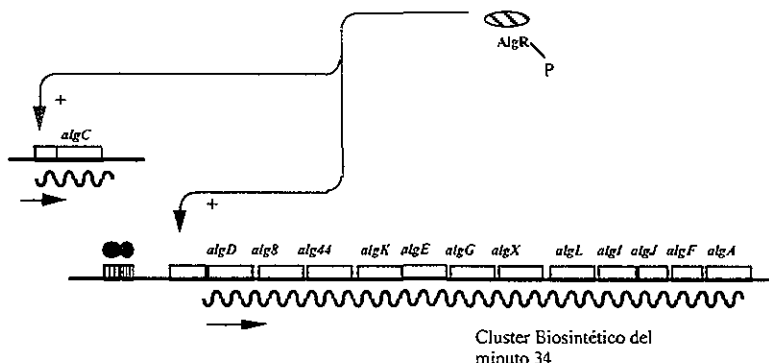


Figura 7. Modelo de regulación de los genes biosintéticos de alginatos en *Pseudomonas aeruginosa*.

Zielinski, N.A. *et al* en 1991, Clonaron y caracterizaron el gen *algC* que codifica para la enzima fosfomanomutasa esta enzima participa en la síntesis de alginato, convirtiendo la manosa-6-fosfato a manosa-1-fosfato para la formación de los residuos de ácido manurónico. Goldberg, J. B. *et al*, en 1993, reportaron que la enzima fosfomanomutasa (*algC*) participa en la síntesis de antígeno O del lipopolisacárido de la pared, mediante su actividad fosfomanomutasa. Más tarde Coyne, M.J., *et al*, 1994 reporta que la síntesis de la región "core" del LPS, formada por glucosa, galactosamina, heptosa y ramnosa, también esta afectada. Ellos demuestran que el producto del gen *algC* también participa en el paso de glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato, y que AlgC es una enzima con actividad tanto de fosfomanomutasa como de fosfoglucomutasa (Fig. 8).

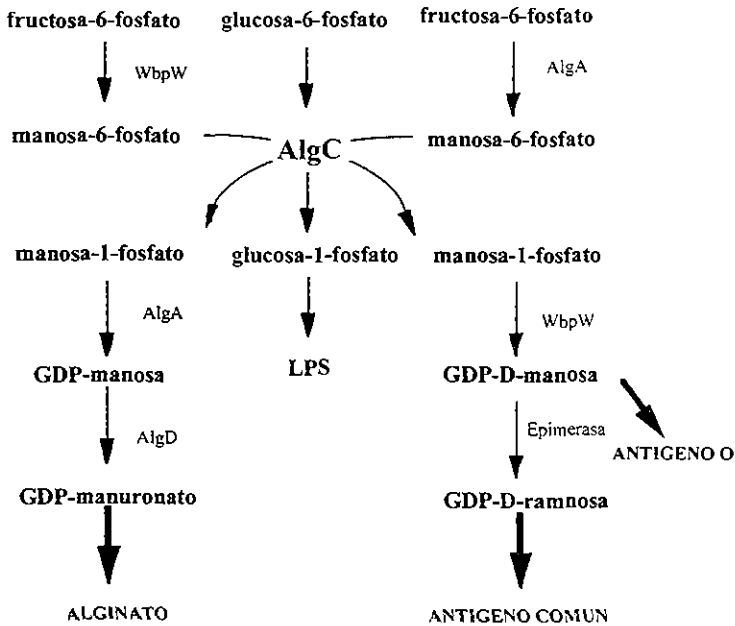


Figura 8. Vías de biosíntesis de LPS y alginatos donde participa la enzima bifuncional AlgC con actividad fosfomanomutasa-fosfoglucomutasa.

El gen *algC* es el único gen estructural de la síntesis de alginato que se encuentra fuera del “cluster” biosintético. Este gen tiene 1388 nucleótidos y se sabe que su regulación es dependiente del factor sigma E (AlgU) y del regulador de respuesta AlgR que pertenece al sistema de transducción de señales de dos componentes (Fig. 7) (Mohr, *et al.*, 1992).

“Quorum sensing”

Las bacterias llevan a cabo censos poblacionales eficientemente. Se han encontrado muchos ejemplos de genes, operones y regulones bacterianos que se

expresan preferentemente en alta densidad celular y que son regulados por proteínas relacionadas con las proteínas LuxR y LuxI de *Vibrio fischeri* y por feromonas difusibles llamados autoinductores, la más importante la Oxo-hexanoil homoserina lactona (OHHL). Las proteínas LuxR y LuxI son importantes como modelo para describir la función de esta familia de reguladores transcripcionales; LuxR es un receptor de OHHL y un activador transcripcional dependiente de OHHL y LuxI dirige la síntesis de OHHL. La OHHL es difusible a través de la envoltura celular y la concentración intracelular de este se incrementa fuertemente por bacterias productoras cercanas.

La región entre *luxR* y *luxI* contiene los elementos regulatorios del promotor *lux*. El gen *luxI* se autorregula positivamente. A niveles basales de la transcripción del operón de luminiscencia la producción de autoinductor es baja, cuando la densidad celular aumenta, la concentración de autoinductor se incrementa hasta alcanzar una concentración crítica en la cual el autoinductor se une a el activador transcripcional LuxR aumentando la transcripción de operón de luminiscencia así como la de la sintetasa del autoinductor (Greenberg, 1998).

Sistemas similares regulan factores de patogénesis en *Erwinia* spp. *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa* y muchos otros genes de bacterias gram negativas (Fuqua, *et al* ,1996) (Tabla 2).

Organismo	Fenotipo	Autoinductor sintetasa	Regulador transcripcional	Autoinducto
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Conjugación	TraI	TraR	OOHL
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Antibióticos, exoenzimas, violaceína	CviI	CviR	HHL
<i>Erwinia carotovora</i>	Antibióticos, exoenzimas	CarI	CarR	OHHL
<i>Erwinia stewartii</i>	Exopolisacárido	EsaI	EsaR	OHHL
<i>Escherichia coli</i>	División celular	?	SdiA	?
<i>Vibrio (Photobacterium) fischeri</i>	Bioluminiscencia	LuxI	LuxR	OHHL, HHL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Proteasa alcalina, elastasa, exotoxina A, exoenzima S, neuraminidasa, hemolisina.	LasI	LasR	OdDHL
	Quitinasas, elastasa, piocianina, ramnolípido, RpoS	RhlI	RhlR	BHL
<i>Serratia liquefaciens</i>	Motilidad, fosfolipasa	SwrI	?	BHL

Tabla 2. Sistemas de regulación “quorum sensing” en diversos microorganismos.

Los análisis genéticos de estos sistemas han revelado ciertas regiones altamente conservadas, sin embargo, los niveles de similaridad total en secuencia son frecuentemente bajas entre el 18 y el 25% de identidad entre los homólogos de LuxR y entre el 28 y el 35% para los homólogos de LuxI. Las proteínas homólogas a LuxR y LuxI producen autoinductores los cuales son acil homoserina lactonas similares o idénticos al OHHL de *Vibrio fischeri* (Fuqua, *et al*, 1996) (Tabla 2).

“Quorum sensing” en *Pseudomonas aeruginosa*

En *Pseudomonas aeruginosa* la regulación activada por autoinductor (acil-homoserina lactona) esta involucrada en la regulación de diferentes exoproductos incluyendo la elastasa, la proteasa alcalina, la proteasa *lasA*, la hemolisina, la piocianina y los ramnolípidos, estos productos se sintetizan (cuando la densidad celular es alta) en la fase estacionaria de crecimiento. Este mecanismo de regulación es denominado “quorum sensing” (Salmond G.P.C. *et al*, 1995).

Pseudomonas aeruginosa contiene dos sistemas de “quorum sensing”, Las y Rhl. Entre ambos sistemas existe una herarquía en el cual el sistema LasR es dominante sobre Rhl, tanto transcripcional, como postranscripcionalmente (Fig. 9). Se ha demostrado que LasR activa la transcripción de *rhlR*, así como la producción de autoinductor Butanoil homoserina lactona (BHL) producido por RhlI. Adema la interaccion de RhlR-BHL es bloqueada por el autoinductor dodecanoil homoserina lactona (OdDHL) producido por LasI, inhibiendo la transcripción de los genes dependientes del sistema Rhl (Latifi, *et al*, 1996, Fuqua and Greenberg, 1998).

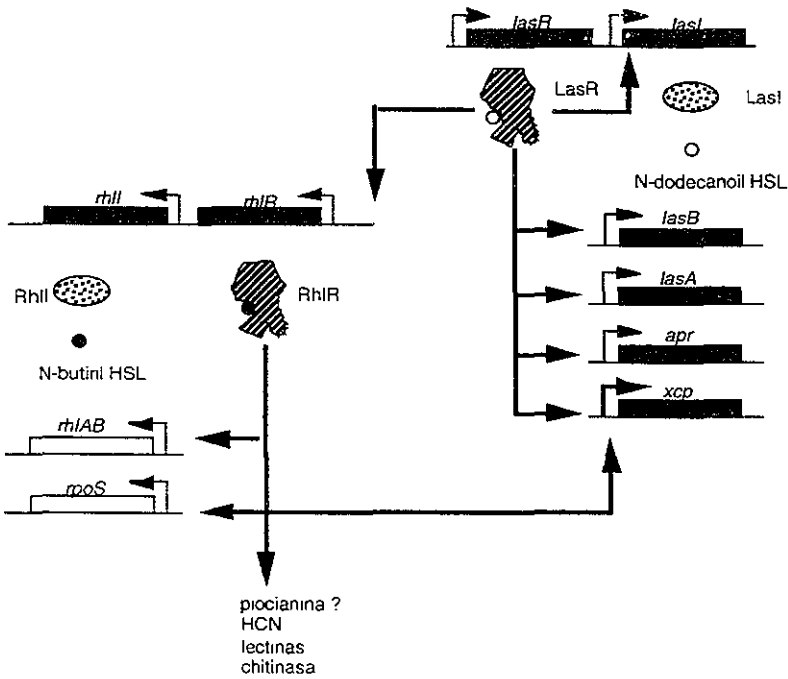


Figura 9. Cascada regulatoria de los sistemas de “quorum sensing” presentes en *Pseudomonas aeruginosa*.

Sistema LasR-LasI

La proteína LasR es un homólogo de LuxR que actúa como activador transcripcional en presencia de el autoinductor de *Pseudomonas aeruginosa* OdDHL (N-(3-oxododecanoil-L-homoserina lactona), cuya síntesis es dirigida por LasI homólogo de LuxI. Cuando la densidad celular es alta PAI-1 alcanza el umbral de concentración y se une a LasR causando que la proteína se vuelva un activador transcripcional. LasR-OdDHL controlan la transcripción de diversos genes de

virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*, Incluyendo *lasI*, *lasB*, *apr*, *toxA* y así como el sistema regulatorio Rhl (Pesci, *et al* 1997)

Sistema RhIR-RhII (VsmR-VsmI): gen regulador *rhIR*

Ochsner *et al.*, en 1994, aislaron y caracterizaron los genes *rhIABRI* involucrados en la biosíntesis de ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa*. El sistema regulador de esta biosíntesis está constituido por una proteína reguladora RhIR que se activa por la unión de un autoinductor (butanoil-L-homoserina lactona), producido por la enzima RhII (sintetasa del autoinductor). (Ochsner *et al*, 1995)

El gen regulador *rhIR* pertenece a la familia de los genes *luxR*. Estas proteínas tienen un sitio de unión a DNA y otro de unión a un autoinductor, el regulador RhIR participa también en la regulación de la elastasa, proteasa y piocianina (Ochsner *et al*, 1994)

Factor sigma 38 (RpoS)

El factor sigma 38 se identificó originalmente en *Escherichia coli* y en *Salmonella typhimurium* como un factor sigma alternativo que activa la expresión de numerosos genes requeridos para mantener la viabilidad celular durante la fase estacionaria de crecimiento ó cuando las células están experimentando deprivación nutricional (Kolter, *et al* 1993, Loewen, *et al* 1994). La activación de estos genes hace a la bacteria más resistente al estrés ambiental como deprivación nutricional, estrés osmótico y estrés oxidativo. RpoS juega un papel importante en las células creciendo exponencialmente que son expuestas al incremento de la osmolaridad, además induce más de 30 genes en respuesta a varios factores de estrés. RpoS

también activa a genes de virulencia en diversas bacterias incluyendo, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Shigella flexneri*. (Hengge-Aronis, 1996)

Dentro del genero *Pseudomonas*, el papel de RpoS es generalmente de regulador de respuesta al estrés. En *P. fluorescens* RpoS también regula la producción de antibióticos y afecta la actividad de control biológico de la bacteria.

La transcripción del gen *rpoS* de *Pseudomonas aeruginosa* se activa por el sistema RhlR-BHL lo que indica que este gen está bajo el control de “quorum sensing”. RpoS esta involucrado en la regulación de numerosos genes que son importantes para la sobrevivencia bajo condiciones adversas. En *Pseudomonas aeruginosa* se ha reportado que afecta factores de virulencia como alginatos, catalasa, exotoxina A, piocianina, pioverdina y motilidad (Sang-Jin Suh, *et al* 1999).

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la biosíntesis de la dTDP-L-ramnosa y la regulación de los genes biosintéticos en *Pseudomonas aeruginosa*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- a) Caracterizar los genes involucrados en la biosíntesis de la TDP-L-ramnosa de *Pseudomonas aeruginosa*.
- b) Establecer algunos aspectos de la regulación de los genes biosintéticos de dTDP-L-ramnosa de *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas, plásmidos, medios y condiciones de cultivo:

Las cepas utilizadas en este trabajo se presentan en la Tabla 3. Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio Luria Broth (LB; Gibco, BRL, Burlington, Ontario, Canada) a 37°C. Las cepas de *P. aeruginosa* se crecieron en medio PIA (PIA; Difco Laboratories, Detroit, Michigan) a 29°C. Los antibióticos utilizados en los medios de selección fueron: ampicilina (Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri) 200 µg/ml para *E.coli*; carbenicilina 200 µg/ml para *P. aeruginosa*; gentamicina (Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri) 10 y 300 µg/ml para *E.coli* y *P. aeruginosa* respectivamente; tetraciclina (Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri) 200 µg/ml para *P. aeruginosa*. Para la determinación de ramnolípidos y de la actividad enzimática de la TDP-glucosa-4,6-deshidratasa; las cepas de *P.aeruginosa* se crecieron en medio líquido bajo en fosfatos denominado PPGAS (Zhang and Miller *et al*; 1995) a 200 rpm y a 29°C.

Tabla 3. Cepas y plásmidos utilizadas en esta trabajo.

<u>Cepa</u>	<u>genotipo o características relevantes</u>	<u>Referencia</u>
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Cepa silvestre no mucoide	Holloway, <i>et al.</i> 1979
PG201	Cepa silvestre prototrófica	Guerra, <i>et al.</i> 1986
65E12	PG201 mutante en <i>rhIR</i>	Ochsner, <i>et al.</i> 1994
PAO1 <i>rpoS</i> ::Gm	PAO1 mutante en <i>rpoS</i>	Este estudio

AK1012	PAO1 mutante en <i>algC</i>	Coyne, <i>et al.</i> 1994
CDM1/1	PAO1 mutante en <i>algR</i>	Mohr, <i>et al.</i> 1990
PAO1 <i>algD</i> ::Tc	PAO1 mutante polar en <i>algD</i>	Chitnis, <i>et al.</i> 1993
8830	Aislado clínico mucoide	Zelinski, <i>et al.</i> 1991
8858	8830 mutante en <i>algC</i>	Zelinski, <i>et al.</i> 1991

E. coli

DH5 α	Cepa Hospedero	Gibco
HB101	Cepa Hospedero	Gibco
DH1	Doble mutante, afectada en el gen <i>rfbD</i> , y en la ramnosil transferasa de LPS	Clark, <i>et al.</i> 1992

Plásmidos

pCLD28	pUC19 conteniendo el promotor <i>rmlB</i>	Este estudio
pR1556	pUC19 conteniendo el gen de la ramnosiltransferasa de LPS	Clark, <i>et al.</i> 1992
pR1168	pUC18 conteniendo el <i>rfbD</i> de <i>S. typhimurium</i>	Clark, <i>et al.</i> 1992
pCOC1	pKS conteniendo el gen <i>rpoS</i>	Este estudio
pCOC2	pCOC1 con una inserción en el gen <i>rpoS</i>	Este estudio
pRML4	pUC19 llevando los genes <i>rmlBDAC</i>	Este estudio
pUC19	Vector de clonación	Promega
pBluescript-II KS	Vector de clonación	Stratagene
pBSI.141	Vector que contiene el cassette de Gm	Alexeyev, <i>et al.</i> 1995

pLPS1881	pUCP19 llevando el gen <i>algC</i>	Coyne, <i>et al</i> 1994
pJG309	pCP13 llevando el gen <i>algU</i>	Goldberg <i>et al</i> 1993

Manipulación del DNA

Los procedimientos estándar para purificación de DNA total y de plásmidos, digestiones con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa, ligación de DNA y transformación de *E. coli* se realizaron según lo descrito en Sambrook, *et al.* 1989. Las purificaciones de DNA de geles de agarosa se realizaron con el kit Gene Clean III (Bio/Can Scientific, Mississauga, Ontario, Canada). Las secuencias se realizaron con la enzima thermosequenase (Amersham)

Amplificación de la región promotora de *rmlB* y construcción del plásmido pCLD28

La amplificación de la región promotora de *rmlB* se llevó acabo mediante PCR utilizando la enzima Vent polimerasa de Amersham, se utilizó como templado el DNA cromosomal de *P. aeruginosa* PAO1; los oligonucleótidos utilizados *rmlB61* (5'-CTGGCACCGCCGCGCCACCCAGC-3') y *rmlB62* (5'-CGCCCGCGGCTGGTACCCGGCG-3') se diseñaron apartir de la secuencia obtenida del banco de datos del genoma completo de *P. aeruginosa* (*Pseudomonas* genome project; <http://www.pseudomonas.com>; Pathogenesis Corporation). La mezcla de aplicación se preparó de la siguiente forma 200ng de DNA cromosomal 50 pmol de cada oligonucleótido, 2.5 mM de dNTPs y 1X de buffer que contiene MgCl₂ 2.25 mM. Se utilizó un Rothermocycler gradient 40 (Stratagene). El producto amplificado de 865pb se clonó en el vector de clonación pUC19 en el sitio HincII, esta construcción se denomino pCLD28.

Análisis de de hibridación DNA-RNA en gota (“Dot blot”)

La purificación de RNA se realizó según la técnica de Barry *et al.*, 1992 modificada para *P. aeruginosa*. El RNA se fijo con UV y con NaOH 0.4 N en una membrana de nitrocelulosa Hybond N + (Amersham) conforme indicaciones del fabricante. Las sondas se marcaron radioactivamente por la técnica de “random primer” con el kit redi-primer de Amersham, según indicaciones del fabricante. La hibridación RNA-DNA se llevo acabo en condiciones desnaturalizantes con formamida (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizó un sonda que contiene los genes ribosomales de *Escherichia coli*, como estándar interno para la concentración de RNA total, obtenida del plásmido pKK3535, el cual fué facilitado por Virginia Wheaton de la Universidad de California, Santa Cruz, USA.

Análisis de extensión de iniciadores

Los ensayos de extensión de iniciadores “primer extension” para la identificación del inicio de transcripción, se realizaron con 50 µg de RNA purificado de cultivos crecidos en medio PPGAS. La reacción de extensión de iniciadores se realizó de la siguiente manera: la reacción de marcaje del oligo nucleótido *rml-250* (5'-GCCGGCACCAAGGACTCGGAACCCGGG-3') se llevó a cabo con gama ATP (P³²), con la enzima polinucleótido cinasa (Boheringer), y 20 picomoles del oligonucleótido, el volumen de reacción fué de 20 µl, se incubó 1 hr. Para reacción de extensión se utilizó el sistema de Amersham siguiendo la instrucciones del fabricante. Se utilizó en la reacción las siguientes cantidades RNA 50 µg, NaCl 2.5 mM, 1.76 µl, Tris HCl 1M, 0.66 µl; del oligonucleótido marcado con P³², 5 pmol; inhibidor de enzimas degradadoras de RNA, 25 U; DTT 10 mM, 3.7 de dNTPs 40 mM, 2 µl y 10 U de la transcriptasa reversa. El RNA junto con el NaCl, el Tris HCl

y los oligonucleótidos, se desnaturalizaron a 55°C por tres minutos. Posteriormente se añadió el resto de los reactivos ajustando la reacción a 40 μ l. La extensión se realizó durante 1 h a 42°C. El DNA copia (cDNA) resultante de la reacción de la transcriptasa reversa, se precipitó con 10 μ l de acetato de amonio 10 M y 100 μ l de etanol durante toda la noche. Después de precipitar el cDNA se lavó con etanol a 70% y se resuspendió en 10 μ l. Simultáneamente se realizó una secuencia nucleotídica, usando el mismo iniciador para identificar el sitio de inicio de la transcripción.

Actividad enzimática de dTDP-glucosa 4,6 deshidratasa

La actividad se determinó como se describe en Marumo, *et al.* 1992. La reacción se llevo a cabo con 15 μ mol de Tris/HCl, pH 7.6, 1.2 μ mol dTDP-D-glucosa y una alícuota apropiada de la enzima en volumen total de 500 μ l y se incubó a 37°C. Se tomaron muestras de 50 μ l de reacción a intervalos de 10 min adicionando 750 μ l de NaOH 0.1 M y reincubadas a 37°C por 20 min. La generación del producto de esta reacción se determinó mediante un análisis espectrofotométrico a 320 nm (ϵ 320 = 4600 M⁻¹ . cm⁻¹) la velocidad inicial en unidades de enzima (U) definidas como μ mol de producto (dTDP-6-desoxi-D-xylo-4-hexulose) formado por minuto por gr de proteína.

Determinación de ramnolípidos

La concentración de ramnolípidos se determinó midiendo la cantidad de ramnosa liberada después de una hidrólisis ácida usando el método de orcinol (Chandrasekaran, *et al.* 1980). La cantidad relativa de mono- y di-ramnolípido se determinó mediante cromatografía en capa fina usando como solventes cloroformo-

metanol (1:2) y cloroformo-metanol-hidróxido de amonio 5M (80:24:4) y revelando con alfa-naftol (Wild, *et al*; 1997).

Amplificación del gen *rpoS*, construcción del plásmido pCOC2 y construcción de la mutante en *rpoS*.

El gen *rpoS* de *P. aeruginosa* se amplificó por PCR utilizando la enzima Vent polimerasa de Amersham. Se utilizó el DNA cromosomal de *P. aeruginosa* PAO1 como templado. Los oligonucleótidos utilizados *rpoS1* (5'-GGGGGAAGG ATTGAGGCTAGCAGCGACC-3') y *rpoS2* (5'-GAAGCGGCGAATCACCA CACCA-3') se diseñaron en base a la secuencia de *rpoS* descrita por Tanaka and Takahashi, en 1994. La mezcla de amplificación se preparó como se describe en la amplificación del gen *rmlB*. El producto resultante tiene un tamaño de 1839pb, este fragmento se digirió con las enzimas de restricción *PstI* y *SmaI*. Este fragmento se clonó en el vector de clonación pBluescript-II-KS (Stratagene), esta construcción se denominó pCOC1. El gen *rpoS* subclonado se interrumpió en el sitio *Hinc II* mediante inserción de un cassette de gentamicina. La construcción con el gen *rpoS* interrumpido con el cassette de gentamicina se denominó pCOC2. La mutagenesis se llevó a cabo por electrotransformación del plásmido pCOC2 a la cepa PAO1. Las doble recombinantes se seleccionaron por ser resistentes a gentamicina y sensibles a carbencilina. La mutagenesis fue corroborada por hibridación DNA-DNA tipo southern

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Artículo: The *Pseudomonas aeruginosa atgC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis.



The *Pseudomonas aeruginosa algC* gene product participates in rhamnolipid biosynthesis

Clarita Olvera ^a, Joanna B. Goldberg ^b, Rosalba Sánchez ^a,
Gloria Soberón-Chávez ^{a,*}

^a Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México Apdo Postal 510-3 Cuernavaca 62250, México

^b Department of Microbiology, University of Virginia, Health Science Center, Charlottesville, VA 22908, USA

Received 20 May 1999; received in revised form 7 July 1999; accepted 8 July 1999

Abstract

Pseudomonas aeruginosa produces exoproducts correlated with its pathogenicity. One of these virulence-associated traits is the surfactant rhamnolipid. The production of alginate and lipopolysaccharide (LPS) are also of importance for *P. aeruginosa* virulence. The product of the *algC* gene (which is involved in alginate production through its phosphomannomutase activity and in LPS synthesis through its phosphoglucomutase activity) participates in rhamnolipid production, presumably catalyzing the first step in the deoxy-thymidine-diphospho-L-rhamnose (dTDP-L-rhamnose) pathway, the conversion of glucose-6-phosphate to glucose-1-phosphate. Other structural *alg* genes, encoded in the *alg* operon, are not involved in rhamnolipid nor LPS production. These results show that the AlgC protein plays a central role in the production of the three *P. aeruginosa* virulence-associated saccharides: alginate, LPS and rhamnolipid. © 1999 Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Rhamnolipid; Lipopolysaccharide; Alginate; *Pseudomonas aeruginosa*

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen causing serious nosocomial infections [1]. The secretion of numerous toxic compounds and hydrolytic enzymes is correlated with pathogenicity [2]. These exoproducts include proteases, phospholipase C, exotoxin A, pyocyanin and rhamnolipids [3].

P. aeruginosa produces mainly two types of rhamnolipids called monorhamnolipid and dirhamnolipid (Fig. 1). Rhamnolipid production proceeds by two rhamnosyl transfer reactions, each catalyzed by a specific rhamnosyltransferase [4]. In both of these reactions, deoxy-thymidine-diphospho-L-rhamnose (dTDP-L-rhamnose) acts as the rhamnosyl donor and β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate or monorhamnolipid are the respective recipients.

Production of the exopolysaccharide alginate and lipopolysaccharide (LPS) are important for *P. aeruginosa* virulence [5–7]. In cystic fibrosis (CF), an inherited disease, *P. aeruginosa* chronically colonizes

* Corresponding author. Tel.: +52 (73) 2916311; Fax: +52 (73) 172388; E-mail: glori@iibt.unam.mx

the lungs of patients and the infection by mucoid (alginate producing) strains is a major factor for morbidity and mortality [5]. LPS defective *P. aeruginosa* strains are less virulent to mice [6,7].

The LPS of *P. aeruginosa* includes lipid A (endotoxin), the LPS core and, attached to it, the O-antigen (also called B-band LPS) [8]. *P. aeruginosa* makes a second polysaccharide antigen attached to the LPS core [8], which is conserved among different isolates. This common antigen (also called A-band LPS) is composed mostly of D-rhamnose. The O-antigen structure is the serotype-specific determinant and in some serotypes, it contains L-rhamnose as one of its constituents [9]. Guanosine diphospho-mannose (GDP-mannose), besides being an alginate precursor, is the precursor of GDP-D-rhamnose for common antigen [10] (Fig. 2). In *P. aeruginosa*, there are at least two homologs of the alginate gene product, AlgA, the bifunctional enzyme phosphomannose isomerase-GDP-mannose pyrophosphorylase, and one of them, WbpW, is involved in common antigen biosynthesis [11]. Thus, the biosynthesis of rhamnose is integral to the production of at least two polysaccharides (Fig. 2).

The molecular genetics of alginate production in *P. aeruginosa* have been widely studied [12]. This metabolic pathway involves the conversion of fructose-6-phosphate to GDP-mannose via mannose-6-phosphate and mannose-1-phosphate intermediates (Fig. 2). The commitment enzyme in this pathway is GDP-mannose dehydrogenase (encoded by the *algD* gene), which converts GDP-mannose, a metabolite used for the synthesis of different saccharides

such as GDP-D-rhamnose [10], to GDP-mannuronic acid, a direct alginate precursor. The *algC* gene encodes a phosphomannomutase enzyme which catalyzes the second step in the pathway, i.e. the conversion of mannose-6-phosphate to mannose-1-phosphate. This enzyme has been shown to have also a phosphoglucomutase activity and to be involved in LPS synthesis [13], presumably participating in the biosynthesis of glucose and rhamnose needed for the formation of core-LPS (Fig. 2).

The *algD* gene is located in a synthetic cluster which contains most of the genes encoding the enzymes involved in alginate synthesis, with the exception of the *algC* gene. This *alg* gene cluster is transcribed as an operon [14], which is controlled from the *algD* promoter via positive transcriptional regulation by the AlgR protein [15].

We report here that AlgC activity is essential for rhamnolipids production, possibly through its phosphoglucomutase activity, while the products of the *alg* genes in the biosynthetic cluster are not involved in rhamnolipid production nor in LPS synthesis.

2. Materials and methods

2.1. Microbiological procedures

Bacterial strains and plasmids used are shown in Table 1. Antibiotic concentrations used for *P. aeruginosa* were 300 µg ml⁻¹ carbenicillin (Cb) and 150 µg ml⁻¹ tetracycline (Tc).

Table 1
P. aeruginosa strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
PAO1	Wild-type strain, LPS ⁺	B. Halloway
AK1012	PAO1 <i>algC</i> mutant, LPS ^d	[13]
CDM1/1	PAO1 <i>algR</i> mutant	[22]
PAO1 <i>algD</i> Tc	PAO1 <i>algD</i> mutant unable to express the <i>alg</i> genes of the biosynthetic operon, Tc ^r	[14]
8830	Mucoid C1 isolate, LPS ^d	[23]
8858	8830 <i>algC</i> mutant, non-mucoid, LPS ^d	[23]
Plasmids		
pLPS188	pUCP19 containing <i>P. aeruginosa</i> <i>algC</i> gene, Cb ^r	[13]
pJG109	pCPI3 with the <i>algC</i> gene, Tc ^r	[26]

Abbreviations used: resistance to Cb (Cb^r), chloramphenicol (Cm^r) and Tc (Tc^r). LPS⁺ means production of wild-type, LPS, LPS^d means no A- or B-band LPS produced.

2.2. LPS characterization

LPS was isolated and characterized by a Western blot procedure as described [13].

2.3. Rhamnolipids determination

The total rhamnolipids concentration was determined from cell culture supernatants in PPGAS medium [16] by measuring the rhamnose concentration after acid hydrolysis using the orcinol method [17]. Thin layer chromatography was used to detect the two types of rhamnolipids produced in liquid culture [16].

3. Results and discussion

3.1. The AlgC protein is involved in rhamnolipid synthesis

We hypothesized that the phosphoglucosyltransferase activity of AlgC was responsible for the production of glucose-1-phosphate, the precursor of dTDP-glucose and ultimately of dTDP-L-rhamnose (Fig. 2). If this hypothesis was correct, an *algC* mutant should be unable to make rhamnolipids. The lack of glucose-1-phosphate production in the *algC* mutant would also explain the production of a defective LPS, since neither dTDP-glucose nor dTDP-rhamnose, which are core-LPS precursors, would be made. In agreement with this hypothesis, the PAO1 *algC* mutant strain AK1012 does not produce rhamnolipids at detectable levels and the complementation in *trans* of this mutation with the *algC* gene (plasmid pLPS188) restored the ability to produce rhamnolipids (Table 2 and Fig. 3B) and LPS [13].

To further substantiate the AlgC involvement in rhamnolipid production, we determined the synthesis of these surfactants by the non-mucoid *algC* mutant derived from the mucoid and LPS defective CF isolate 8830 and by the complemented strain 8858 (pLPS188). Rhamnolipid production by the mutant strain was undetectable, while the introduction of plasmid pLPS188 rendered the cells mucoid and they regained the ability to produce rhamnolipids (Table 2). It was also apparent from these determinations that strain 8830 produced high rhamnolipid

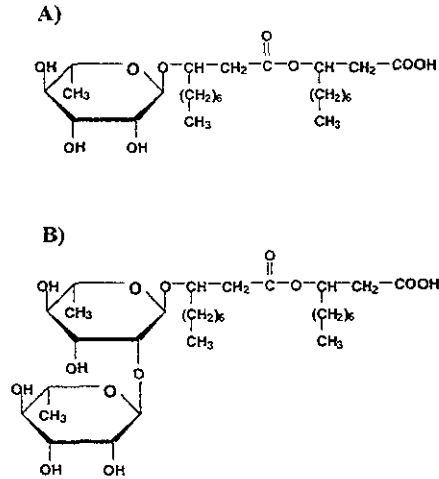


Fig. 1. Schematic representation of monorhamnolipid (A) and dirhamnolipid (B) molecules.

levels and that plasmid pLPS188 did not restore its production to mutant 8858 to wild-type levels (Table 2). Mutant 8858 was derived from strain 8830 by EMS mutagenesis [23], so it is possible that other mutations, distinct from *algC*, might be responsible for the lack of its full complementation by plasmid pLPS188. The LPS defect of strain 8830 is caused by an unidentified mutation which was not complemented by plasmid pLPS188 (Table 2).

The AlgC protein plays a central role in the production of three *P. aeruginosa* virulence-associated traits, alginate, rhamnolipids and LPS, although the production of these compounds is subject to a completely different genetic and environmental regulation. Highly mucoid strains are mainly found in the lungs of CF patients [18]. Genes encoding the first specific rhamnosyl transferase for rhamnolipid production (*rhlAB*) need the positive transcriptional activator RhIR [19] which forms part of a very complex regulatory cascade [20] and responds specifically to high bacterial densities [21]. On the other hand, there have been no reports of regulation of LPS production at the transcriptional level.

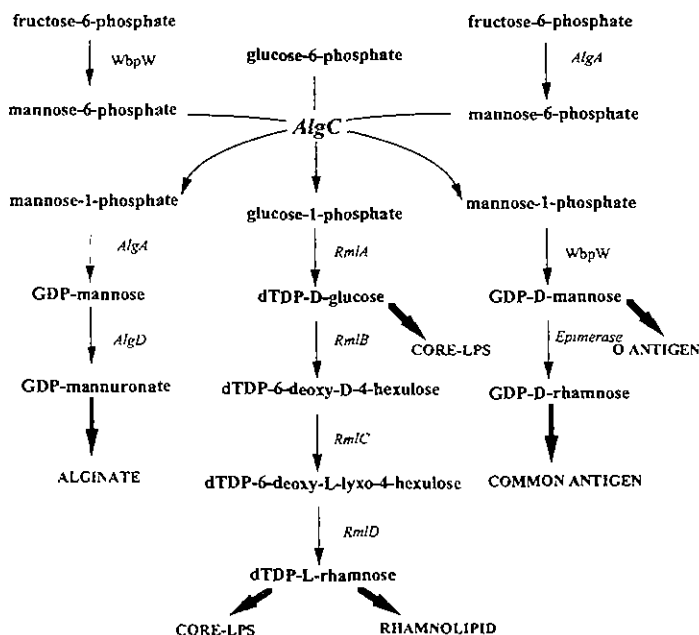


Fig. 2. Schematic representation of the *P. aeruginosa* PAO1 metabolic routes for the production of rhamnolipid, alginate and LPS. Abbreviations are given in the text. Bold arrows represent multiple enzymatic steps. AlgA and WbpW are shown twice because they are bifunctional enzymes, as described in the text.

Table 2
Production of rhamnolipids^a by different *P. aeruginosa* strains

Strain	Characteristics ^b	Rhamnolipids
PAO1	Wild-type, non-mucoid, LPS ^c	363 ± 18
PAO1 (pJG109)	Mucoid, LPS ^c	380 ± 11
AK1012	Non-mucoid, LPS ^d	ND
AK1012 (pLPS188)	Non-mucoid, LPS ^c	321 ± 19
8830	Mucoid, LPS ^d	686 ± 70
8858	Non-mucoid, LPS ^d	ND
8858 (pLPS188)	Mucoid, LPS ^d	263 ± 7
CDM11/1	Non-mucoid, LPS ^c	373 ± 17
PAO1algD ⁻ Tc	Non-mucoid, LPS ^c	355 ± 12

^aND means not detected. Results represent the mean ± S.D. of the rhamnolipid concentration from three cultures. The rhamnolipid concentration is expressed as µg ml⁻¹ of rhamnose in rhamnolipids extracted with ether from culture supernatants.

^bLPS^c means production of wild-type LPS, LPS^d means no A- or B-band LPS produced. The strain characteristics that have already been reported in the literature are also shown in Table 1.

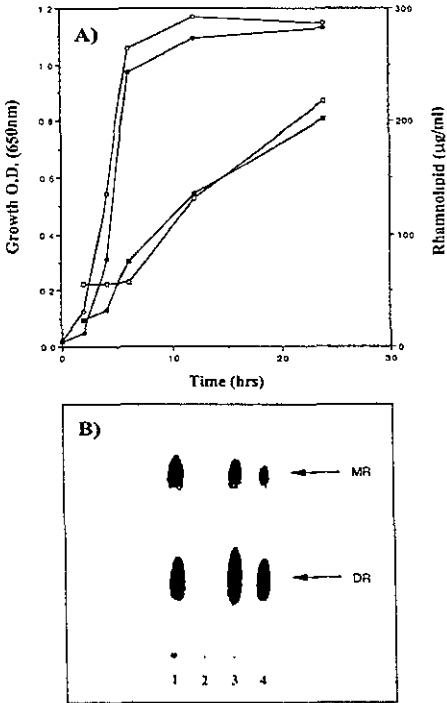


Fig. 3. (A) Time course of rhamnolipid production (□) and growth (○) of the PAO1 strain with (1) and without (□) plasmid pJG309. (B) Thin layer chromatogram of rhamnolipids produced at 24 h of growth by the following strains: (1) PAO1, (2) *algC* mutant AK1012, (3) AK1012 (pLPS188) and (4) PAO1 (pJG309). Arrows show the migration of mono-rhamnolipid (MR) and di-rhamnolipid (DR).

3.2 Effect of the level of *AlgC* expression on rhamnolipid production

The production of these surfactants was determined in CDM111, a PAO1*algR* mutant [22] (Table 1), since *AlgR* has been reported to activate *algC* transcription [23]. The same rhamnolipids and LPS levels were produced in the wild-type PAO1 and its *algR* mutant (Table 2), suggesting that the basal, *AlgR*-independent, transcription of *algC* is sufficient

to express the *AlgC* activity involved in rhamnolipid and LPS production.

The activity of the alternative sigma factor *AlgU* is the limiting step in the expression of all the *alg* genes, including *algC* [23–26]. To determine whether an increase in *algC* expression resulted in an increase in rhamnolipid production, we transferred to the PAO1 strain the plasmid pJG309, which expresses high *AlgU* levels and renders the strain mucoid. The over-expression of *AlgU*, and presumably of *AlgC*, has no effect on the level of rhamnolipids production (Table 2), nor on the time course of their production (Fig. 3A). These results suggest that the *AlgC* activity is not the limiting step in rhamnolipids production.

Even though the amount of rhamnolipids produced by the mucoid strain PAO1 (pJG309), expressing high *AlgC* levels, is not significantly increased, the ratio of di-rhamnolipid to mono-rhamnolipid produced is raised (Fig. 3B). These results suggest that the increase in *AlgC* activity causes an increase of dTDP-L-rhamnose and that the increased availability of this substrate of the rhamnosyl transferases involved in rhamnolipid synthesis displaces the equilibrium towards the production of surfactants with two rhamnose moieties.

3.3 The proteins encoded by the *alg* operon are not involved in rhamnolipids nor LPS biosynthetic pathways

Mutant PAO1*algD* Tc does not express any of the alginate biosynthetic genes, with the exception of *algC*, because the mutation caused by the insertion of the Tc resistance cassette in the *algD* gene is polar on the expression of all the *alg* genes of the biosynthetic operon. Mutant PAO1*algD* Tc produces normal levels of rhamnolipids (Table 2) and has no defect in its LPS, showing that the only *alg* gene product which participates in the production of these saccharides is *AlgC*.

Acknowledgements

We thank Josefina Guzmán for her technical assistance. The part of this research done in Mexico was funded in part by the National Institute of Environmental Health Sciences, Grant P42 ES04940.

References

- [1] Hardalo, C. and Edberg, S.C. (1997) *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23, 47-75.
- [2] Nicas, T.I. and Iglewski, B.H. (1985) The contribution of exo-products to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 31, 387-392.
- [3] McClure, C.D. and Schiller, N.L. (1992) Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 51, 97-102.
- [4] Barger, M.M., Glaser, L. and Burton, R.M. (1963) The enzymatic synthesis of rhamnose-containing glycolipids by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 238, 2595-2602.
- [5] Pier, G.B. (1985) Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J. Infect. Dis.* 151, 575-580.
- [6] Zhou, X., George, E., Frank, D.W., Utley, M., Gilmour, I., Krogfelt, K.A., Claxton, L.D., Luux, D.C. and Cohen, P.S. (1997) Isolation and characterization of an attenuated strain of *Pseudomonas aeruginosa* A/C869, a 3,5-dichlorobenzoate degrader. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1389-1395.
- [7] Goldberg, J.B., Coyne Jr., M.J., Neely, A.N. and Holder, I.A. (1995) Avirulence of a *Pseudomonas aeruginosa* *algC* mutant in a burned-mouse model of infection. *Infect. Immun.* 63, 4166-4169.
- [8] Hatano, K., Goldberg, J.B. and Pier, G.B. (1993) *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: evidence that the O side chains and the common antigens are on the same molecules. *J. Bacteriol.* 175, 5117-5128.
- [9] Liu, P.V., Matsumoto, H., Kusama, H. and Bergan, T. (1983) Survey of heat-stable major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33, 266-264.
- [10] Lightfoot, J. and Lam, J.S. (1993) Chromosomal mapping, expression and synthesis of lipopolysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*: a role for guanosine diphospho (GDP)-D-mannose. *Mol. Microbiol.* 8, 771-782.
- [11] Rocchetta, H.L., Pagan, J.C. and Lam, J.S. (1998) Synthesis of the A-band polysaccharide sugar D-rhamnose requires Rmd and WbpW: identification of multiple AlgA homologues, WbpW and ORF488, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 29, 1419-1434.
- [12] May, T.B. and Chakrabarty, A.M. (1994) *Pseudomonas aeruginosa* genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends Microbiol.* 2, 151-157.
- [13] Coyne Jr., M.J., Russell, K.S., Covey, C.L. and Goldberg, J.B. (1994) The *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene encodes phosphoglucomutase, required for the synthesis of complete lipopolysaccharide core F. *Bacteriol.* 176, 3500-3507.
- [14] Chimus, C.E. and Ohman, D.E. (1993) Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operon structure. *Mol. Microbiol.* 8, 583-590.
- [15] Mohr, C.D., Hibler, N.S. and Deretic, V. (1991) AlgR, a response regulator controlling mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to the FUS sites of the *algD* promoter located unusually far upstream from the RNA start site. *J. Bacteriol.* 173, 5136-5143.
- [16] Wild, M., Caro, A.D., Miller, R.M. and Soberon-Chavez, G. (1997) Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 279-285.
- [17] Chandrasekaran, E.V. and Bemiller, J.N. (1980) Constituent analyses of glycosaminoglycans. *Methods Carbohydr. Chem.* 8, 89-96.
- [18] Lam, J., Chan, R., Tam, K. and Costerton, J.W. (1980) Production of mucoid micro-colonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 28, 546-556.
- [19] Ochsner, U.A., Flechter, A. and Reiser, J. (1994) Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyl-transferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.* 269, 19787-19795.
- [20] Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C. and Iglewski, B.H. (1997) Regulation of the *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179, 3127.
- [21] Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 727-751.
- [22] Mohr, C.D. and Deretic, V. (1990) Gene-scrambling mutagenesis: generation and analysis of insertional mutations in the alginate regulatory region of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 172, 6252-6260.
- [23] Zelinski, N.A., Chakrabarty, A.M. and Berry, A. (1991) Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene encoding phosphomannomutase. *J. Biol. Chem.* 266, 9754-9763.
- [24] Deretic, V., Sehuri, M.J., Boucher, J.C. and Martin, D.W. (1994) Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bacteriol.* 176, 2773-2780.
- [25] Hershberger, C.D., Ye, R.W., Parsek, M.R., Xie, Z.-D. and Chakrabarty, A.M. (1995) The *algT* (*algU*) gene of *Pseudomonas aeruginosa*, a key regulator involved in alginate biosynthesis, encodes an alternative σ factor (σ^T). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7941-7945.
- [26] Goldberg, J.B., Gorman, W.L., Flynn, J.L. and Ohman, D.E. (1993) A mutation in *algW* permits *trans* activation of alginate production by *algI* in *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* 175, 1303-1308.

Caracterización de los genes *rml* involucrados en la síntesis de la TDP-L-ramnosa

En diversos microorganismos el grupo de genes biosintéticos de la TDP-L-ramnosa ya se ha reportado. Estos cuatro genes denominados *rfbABCD* se encuentran organizados en un operón. Con el fin de identificar los genes de la síntesis de la TDP-L-ramnosa dentro de el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* mediante análisis de homología (*Pseudomonas* genome project; <http://www.pseudomonas.com>; Pathogenesis Corporation) utilizamos la secuencia nucleotídica de los genes biosintéticos de la TDP-L-ramnosa de *Xanthomonas campestris* (organismo relacionado genéticamente con *P. aeruginosa*). Dentro del contig 54 se encontraron cuatro marcos abiertos de lectura que presentan identidad con los genes *rfb* de *X. campestris*.

El ORF 1 presentó identidad con el gen *rfbB* de diversos microorganismos entre ellos *X. campestris*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* y *E. coli* (Tabla 4). El gen *rfbB* codifica para una dTDP-D-glucosa-4,6-deshidratasa. El ORF 2 presenta identidad con el gen *rfbD*; este codifica para la dTDP-6-desoxi-L-manosa deshidrogenasa, la cual es la última enzima de la vía biosintética de la TDP-L-ramnosa. El ORF 3 presentó identidad con el gen *rfbA* el cual codifica para la glucosa-1-fosfato timidililtransferasa. El ORF 4 presenta fuerte identidad con el gen *rfbC* que codifica para la dTDP-6-desoxi-D-glucosa-3,5-epimerasa. Estos resultados sugieren fuertemente que estos ORFs forman el grupo de genes de la biosíntesis de dTDP-L-ramnosa los cuales denominamos *rml* en *P. aeruginosa* (Fig. 10).

CCTGGATGTC GGACGGCGGC GCCACCCAGC ACCACGGCTA CCGCAGCGAA ASCATCAGCC TCTACGACC GCCCACCCAC GAAGCCCTCG CCCAGCTGG 100
Oligo m1B1

CGGCAACACC CAGCGCAAGC CGCGCGTCTT CGACCGGATG GTCCAGAGCC AGGCCTACAT GATGTCCACC ATCGACTACT TCACCATGCT CGGCTGGCTG 200

TTCTCTGCCC TCTGGTGTAT CATCTGGCTG GCCCGCCCGC CGTTCGGGCG CAAGCCCGGC GCGCCCGCCT CGGGCCACTG AGGACGAGC GCATTCGGGC 300
-35 -10 +1

AGGAAATCA GTGGTTTACT CCTGGCGGCG GCTGGCTATA ATGTCCGCGT CTTCCGCGGT ATTAGCTCAGC TGGTAGAGCA ACTGACTTGT AATCACTAGG 400

TCCCGGGTTC GACTCCTGGT GCCGGCACCA TGAATCCCGA AAAGCCCGCC CTCGGCCGGG GCTTTTPTGTT TTATCTCTGT TCTTTCTAC CCAGTGATGG 500

CACTTCGAAT AGAATCGCCG GTCAGATGCA CCAACAGAT CTGGGGTTCG CAGGATCGCC ATTTTTCGCG TACTAATGTG CCGTCTCAGC ATCGATGGT 600

ACACTCTGCC GCGACGTGTC GAAGCAGCCC TAGGACAAAC CACTGCTTGA ACAAGTATG ACTCATGAGC ATTTCTGTGA CCGGCAGCCG CGGCTTCAATC 700
m1B M T I L V T G S A G F I

GGCGCCAAAT TCGTCTCTGA CTGGCTGGCC CTGCATGAGC AGCCGCTGGT CAGCCCTGCAC AAGCTCACTT AGCCCGGCAA CCGGCAGAAC CTCGCCAGCC 800
G A N F V L D W L A L H D E P V V S L D K L T Y A G N R Q N L A S L

TGGAGCGGCA CGCCCGGCAC AACTTCTGTC CGCGGATAT CGCGGATAGC CAGCTGGTAG CCGCGCTGCT CGCCGAGCAC CAGCGCGGCG CGATCTCAA 900
D G D A R H T F V A G D I G D S Q L V A R L L A E H Q P R A I L N

CTTCGCGCGC GAATCCCATC TGGACCGCTC GATCCACGCG CCGGAGGACT TCATCCAGAC CAACATGCTC GGCACCTTCC GCTTCTGTGA AGAAGTGCOC 1000
F A A E S H V D R S I H G P E D F I Q T N I V G T F R L L E E V R

CCCTACTGGG GCGCCCTGGA GCGGSAAGCG AAGGGGCGAT TCCGCTTCT CCACGCTTCC ACGGACGAAG TCTATGGCTC GCTTGCACCC AGCGATCCGG 1100
A Y W G A L E P E A K A A F R F L H V S T D E V Y G S L A P S D P A

CCTTACCAGA GAACAACCCG TAGAGCGGCA ACAGTCCCTA CTCGGCTGCC AAGCGCGCCT CCGACCACTT AGTCCGGGCG TATCACCACA COTATGGCT 1200
F T E N N R Y E P N S P Y S A S K A A S D H L V R A Y H H T Y G L

GCCGTCTGTC ACCACCAAT CCTCGAACA AACCGCGCCG TACCATTGCC CGGAAGAGCT CATCCCACTG GTGATCCACA AGCCCTGCG CCGGACCGCG 1300
P V L T T N C S N N Y G P E K L I P L I P L A I H N A L A G K P

CTGCCGATCT ACGCGCAGCG CCAGCAGATC CCGGACTGCC TCTACGTCAA GGACCAATGC AGCGGCATCC CCGCGGCTCT CGAAGCCCGG CAACTGGGCG 1400
L P I Y G D G Q Q I R D W L Y V K D H C S A I R R V L E A G Q L G E

AGACTACAA TGTGGCGCG TGGAAAGAAA AGCCCAACT CGACCTGGTC GAGAGCTCTT CGCCCATCTT CGACCCAGGAG CAGCCCGCGC CCGACCGCGC 1500
T Y N V C G W N E K A N L D V V E T L C A I L D O E Q P R A D G R

CACCTATCGC GAGCAGATCA CCTTCCTCAA GGATCTCCCG GCGCATGATC CGCGCTAGCC CATCGATGCC ACCCGCTCGG AGCGCGAGCT GCGCTGGAGG 1600
S Y R C Q I T F V K D R P G H D R R V A I D A T R L E H R E L G W K

CGCGCGGAAA CCTTCCGAGC CGGCAATGCC AAGAACCTGC GCTGTACTCT GGACAACGAG GACTGGGTGG CCAACCTAAC CAGCGCTGCC TACCGCGACT 1700
P A E T F E T G I R K T V K W Y L D N O D W V A N V T S G A Y R E W

GCGTGGGTAA CGACTACGCA TGAAGCGGAT CCTTCTGCTC GGCGCAAGG GCGAGATGGC CTGGGAGCTG CAGCCCGCCC TCGCCCGCCT GCGCGAAGCTG 1800
V G K Q Y A

CTGTCTGTGT ACCCTCGCGG CGCGGACTCT GCGGAGCTAA AAGGCTGCGC CGACTGCTT CCGCGGAGC GCGCGCACTT CATCTCAAC GCGCTGCTCT 1900
m1D H N F I L L L G A N G Q V G W E L Q R A L A P L G E L

L V C D R R R A D L A D P C G L A R L V R A E R P P F I V N A C A Y 2000
ACACCGGCTT GGCACAACCG GAGAGCGATG CCGACAACCG CCGTCTGATC AATGCGCGCG CCGTCCGCTT ACTCGCCGAG GAGCGCGCGC CCGTCCCGCG

T A V D K A E S D A D N A Y L I N A R A V A V L A F H A A A C G A 2100
CTGGCTGGTC CATTACTCCA CCGCACTACT GTTGGACCGC CGCGGAGCG TCCCTTTGCG CCAAGACCGC CCGACCGCGC CCGTCAAGCT CTACCGCGACG

W L V H Y S T D Y V F D C A G S V P F A E D A P T G P L S V Y G Q 2200
ACCAAGCTGG AAGCGAGCA GGCATCTGCC GCGAGCGGCT GCGCGCACTT GATCTTCCCG ACCTACTGCG TCTACCGCGC GCGCGCGCA AACTCGGCA

T K L E G E Q A I R A S G C R H L I F R T C W V Y A A R C Q N I A K 2300
AGACCACTCT GCGCTCGCGC GCGTAAAGCG ACGAACCTAA GATGCTGATC GACCACTTCC CCGCGGAGC CAGTCTGAGC CAGTCTGAGC AGTCTGAGCT

T M L R L A G O R D I L F J V A D Q F C A P T S A R L I A D V T A 2400
CGAGTCTGTC GAGCGCTCTT CCGTCACTGT CAGACTGACA CACAGCGCA GCGCACCTTA CCACTTGTGC GCAAGCGCGC AGAAGCTGTC GCACTCTGAT

Q A L Q K L C W D V Y I A A R A T G T Y H L V A C G L T S W H L Y 2500
GATGCTTTCG TCACTGAGCA GCGTCTGAG CCGKXTCGK ARTTGTGATC GATCTGCAK CCGTCTTCCG CAGTCTGAGC CAGAGATAC CCGCTCTGCG

A R F V I E Q A L E R G W E L Q A T P Q R V L P I A T E D Y P V P A
 CGAAGCGTCC GGCCAAITCG CGCCTCGACA ACCGCAAGCT GCACAGGTC TTCCGCGTGG TACTGCGAGA CTGGCGCTAC CATGCGGAC GCATGATCCA 2600
 K R P A N S R L D N R K L Q Q V F G L V L P D W R Y H A G R M I Q
 GSAACTGAGC GASCAGGGAC CACTATGAAA CGCAAGGGCA TCATCCTCGC CGAGGCGTGG GGCACCGCCG TGCACCGCCG AACCGTGGCC ATCTCCAAGC 2700
 E L S E Q G P L
 AGTTGCTGCC GGTGTACGAC AAGCGGATGA TCTACTACCC GCTCAGTACC CTGATGCTGG CGGCGATCCG CGAGATACTG ATCATCTCGA CCCACAGGA
 L L P V Y D K P M I Y Y P L S T L M L A G I R E I L I I S T P Q D 2800
 CACCCACGCG TTCCAGCAGT TGCTGGGCGA CGGTTCGAA C TGCGGCTCGT ACCTOCAATA TGCCGTGCAA CCGTCCCGCG ACGGCTGGCC CCAGGCGTTC 2900
 T P R F Q Q L L G D G S N W G L D L Q Y A V Q P S P D G L A Q A F
 CTGATCGCGG AGTGGTTCAT CGGCAAGCAC CTCAGCGCGC TGGTCCGGG CGACAACCIC TATTAGCGCC AGGACTTCCA CGAGTGTGTC GGCAGCGCTT 3000
 L I G E S F I G N D L S A L V L G D N L Y Y G H D F H E L L G S A S
 CGCAGCGCCA GACCGCGCCG AGTGTCTCGC CCTACCAAGT CGTGGACCCG GAGCGCTACG CGGTGGTCCA GTTCGACCCG GCGCGAAGG CCATCAGCGT 3100
 Q R Q T G A S V F A Y H V L D P E R Y G V V E F D Q G G K A I S L
 GGAAGAGAGC CCACTGGAGC CGAAGTGGAA CTACCGCGTC ACCCGCGTGT AITACTACGA CCAGCAGGTG GTGGACATG CCAAGGACTT GAAGCGCTCG 3200
 E E K P L E P K S N Y A V T G L Y F Y D Q Q V V D I A R D L K P S
 CGCGCGCGCG AGCTGGAGAT CACCGACGTC AACCGCGCCT ATCTGGAGC CGGCCAGCTC AGCGTGGAGA TCATGGCGCG CGGCTACCCG TGGCTGGATA 3300
 P R G E L E I T D V N R A Y L E R G Q L S V E I M G R G Y A W L D T
 CGGCAACCA CBAITGGCTG CTGCGAGCGG GCCAGTTCAT CGCACCGCTG GAGAACCAGC AGGCTTCAA GGTGGCGCTC CGGGAAGAGA TCGCTACCG 3400
 G T H D S L L E A G Q F I A T L B N R Q G L K V A C P E E I A Y R
 GGAGAAGTGG ATCGAGCGCG CGCAACTGGA AAAACTCGCC CGCGCGCTGG CCAAGAAGCG CTAGCGCCAA TACTCTAAGC GCGCTGTCAG CGAGACCGTG 3500
 Q K W I D A A Q L E K L A A P L A K N G Y G Q Y L K R L L T E T V
 TACTGATGAA AGCGACCGCC CTGGCAATTC CGCAGCTCAT CCTCTCGAA CCCCGBSTGT TCGGCGAGCA TCGCGATTC TTCTCGTAAA GCTACAACCA 3600
 Y . M K A T R L A I P D V I L F E P R V F G D D R G F F F E S Y N Q
 GCGCGCTTTC GAGGAGGCTC CGGCTCATCC GGTCAAGTTC GTCCAGGACA ACCAATCCCG TTCCGCGCGT GCGSTCCGCG CGCGCGTCCA CTACAGATC 3700
 R A F E E A C G H P V S F V Q D N H S R S A R G V L R G L H Y Q I
 CGCCAGCGCC AAGGAAACT GGTCCGCGCC ACTCTCGCGC AGGTATTGCA CGTCCCGCTC GACTTGGCTC GCGGCTCGCC GACTTCCGC CAGTGGGTAG 3800
 R Q A Q G K L V R A T L G E V F D V A V D L R R G S P T F G Q W V G
 CGGACCGCCT GACCGCGGAG AACAGCGCC AGATGGGAT TC CGCGCGCC TTCCGCGACG GCTTCTGCTG GCTCAGCGAA TACGCGGAGT TCTCTACAA 3900
 E R L S A E N K R Q M W I P A G F A H G F V V L S E Y A E F L Y K
 GACCACCGAC TTCTGGCGCC CGAAGACGA AGCTGCATC GTCTGGAAAG ATCCCGAGCT GAGATCGAC TCGCCCGTCC AGGATCGCCC CCTGCTTTCG 4000
 T T D F W A P E H E R C I V W N D P E L K I D W P L Q D A P L L S
 GAGAAGGACC GCGAGCGCAA GGCATTCGCC GACGCGGACT GCTTCCCGTG AACCGCAGG AGCGACCGGA CTGCGCGCAA GCGCGATRAA TTAGGGCAT 4100
 E K D R Q G K A F A D A D C F P .
 CCGCTCGCGG ATCGCGCGA TACTCGCAGC CAGCGCAAGT TCGTTCGCTT TGAAGCGTA TTTCATCGC TCGCGCGTCC TGCTCATCTC CGGCTGCTT 4200
 CTCGCGCGCC TGCTCTGGCC CCGCAATAT TTCCCGGAGC GCTACTACAG CGAGCAGTTC GCGGAGAGA ACGCGCAGC GCTCGACCTC TACGTGCGA 4300
 ACTTCTCGCG CACGCTGCGC CGCTACGAG AACTCGCGCA GATCTCGCC GCGCTCGCG TGCTCGCGCA GCGCGTCAA CACACTCGCG AGCGCGCT 4400
 CGAGAGATC GCAACAGAGC CGCTGCGCGA CATCGCGGA CGCACCGCG CCGACTGAT CTACCTGCTC CAACCGAGC GCACCAACCA GGTGCGCTCC 4500
 AACTGGCGCC AGCGGACAG TTCTGTCCAC CGCAACTTCG CCTTCCCGCC CTATTTATCG GAGGCGATGC AGCGCGCGCT GCGCGCGTTC TTGCGCTCG 4600

Figura 10 . Secuencia de los genes biosintéticos de la dTDP-L-ramnosa *rmIBDAC* de *Pseudomonas aeruginosa*

Tabla 4. Identidad a nivel de aminoácidos de los genes *rml* de *Pseudomonas aeruginosa* contra diferentes bacterias gram negativas.

Bacteria	Gen			
	<i>rmlA</i>	<i>rmlB</i>	<i>rmlC</i>	<i>rmlD</i>
<i>E.coli</i>	76%	64%	70%	62%
<i>S.typhi</i>	76%	65%	65%	60%
<i>X.campestris</i>	68%	70%	54%	55%
<i>S.flexneri</i>	75%	64%	60%	62%

Los genes *rml* se aislaron a partir de un cósmido obtenido mediante hibridación; (Cabrera,V.N., Tesis de Licenciatura. 1999) utilizando como sonda un fragmento de 865 pb amplificado por PCR; que lleva parte del gen *rmlB*. Nosotros subclonamos un fragmento *SphI* de 6.3Kb que lleva estos genes (Fig.11); en el plásmido pUC19, esta construcción se denominó pRML4.

1Kb

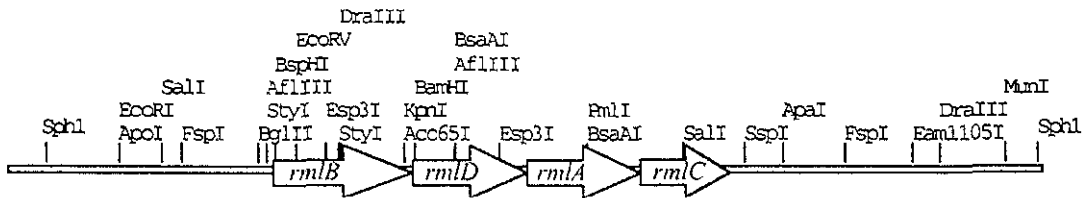


Figura 11. Mapa del fragmento subclonado en el plásmido pRML4 que lleva los genes (*rml*) de la biosíntesis de la TDP-L-ramnosa

Para confirmar que estos genes están involucrados en la síntesis de ramnosa, realizamos la complementación de la cepa DH1 de *E. coli* pR1556 (Clark *et al.* 1992) con el plásmido pRML4. La cepa DH1 es una doble mutante, la primer mutación afecta a la ramnosiltransferasa de LPS de pared; la cual es complementada por el plásmido pR1556, la segunda mutación se encuentra en el gen *rfbD*, llevando a la producción de LPS defectuoso, por la falta de la dTDP-L-ramnosa. El fago Ffm se utilizó para la selección de la cepa complementada, este fago es capaz de lisar las células que tiene un LPS defectuoso, como control positivo usamos la cepa DH1 pR1556 pR1168 complementada con el gen *rfbD* de *Salmonella typhimurium*. La sobrevivencia de la cepa complementada con el plásmido pRML4 demuestra que los genes *rml* de *Pseudomonas aeruginosa* restauran el LPS defectuoso de la cepa mutante, mediante la producción de la dTDP-L-ramnosa, lo que demuestra que estos genes están involucrados en la síntesis de la dTDP-L-ramnosa.

Análisis transcripcional del operón *rml*

La regulación transcripcional de los genes biosintéticos de la TDP-L-ramnosa en otros microorganismos se ha estudiado poco. En *P. aeruginosa* es importante su estudio debido a que la ramnosa participa tanto en la biosíntesis de LPS como en la de los ramnolípidos. Con el fin de conocer algunos aspectos de la regulación transcripcional de este operón, nosotros realizamos análisis de la región corriente arriba del gen *rmlB*. Mediante análisis computacionales se reconoció una secuencia consenso promotora similar al promotor LacUV5, el cual pertenece al grupo de promotores tipo II que reconoce tanto a sigma 70 como a sigma S (Tanaka, *et al.* 1993).

El sitio de inicio de la transcripción se determinó mediante ensayos de

extensión de iniciadores. Se identificó un sitio único de inicio de la transcripción a 312 pb corriente arriba del codon de inicio de la traducción (Fig. 12). Con el fin de saber si existe diferencia en el sitio de inicio de la transcripción según la fase de crecimiento, se realizaron ensayos de extensión de iniciadores en la fase exponencial y estacionaria de crecimiento (datos no mostrados), no se encontró ningún nuevo sitio de inicio de la transcripción.

Justo arriba de este sitio único de inicio de la transcripción se encontró la secuencia promotora con el consenso para $\sigma 70$, antes identificada mediante los análisis de secuencia, lo que sugiere fuertemente que este promotor es funcional.

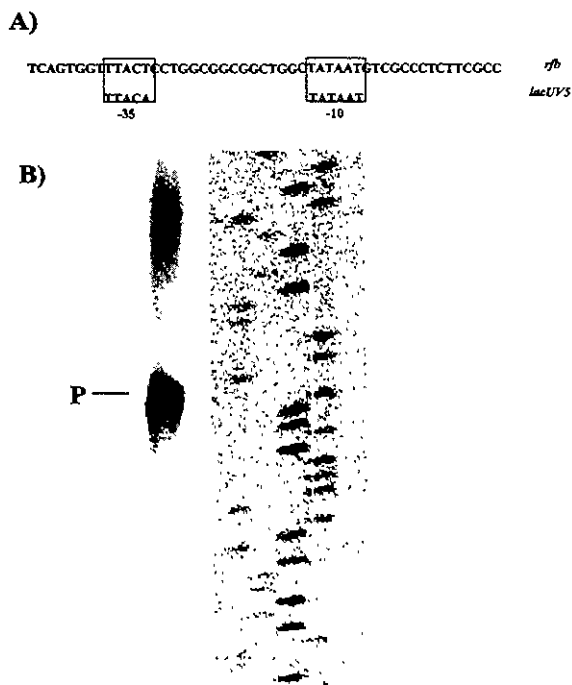


Figura 12. “Primer extension” de la región corriente arriba del operón *rml* de *Pseudomonas aeruginosa*. A) Secuencia de DNA de la región 5’ del operón *rml*

comparándola con el promotor de *Lac UV5*. B) Sitio de inicio de la transcripción de los genes *rml*.

La transcripción del operón *rml* aumenta según la fase de crecimiento.

En *Pseudomonas aeruginosa* la producción de ramnolípidos ocurre en altas densidades celulares en medios con deprivación de fosfatos. Para determinar si la transcripción de los genes biosintéticos del precursor TDP-L-ramnosa también se induce en estas condiciones, se determinó la transcripción del gen *rmlB* a lo largo de la curva de crecimiento. Se realizaron análisis de hibridación de RNA-DNA “Dot blot” a diferentes densidades celulares en los medios PPGAS y LB, utilizando como sonda un fragmento del gen *rmlB*. Observamos un incremento drástico en la transcripción de este gen en la fase estacionaria de crecimiento en el medio PPGAS. Por otro lado, en el medio LB se observa una transcripción basal a lo largo de la curva de crecimiento (Fig. 13). Estos resultados concuerdan con que la producción de ramnolípidos se lleva a cabo en fase estacionaria, en medio PPGAS (medio bajo en fosfatos). En comparación la síntesis de ramnolípidos no se detecta en medio LB (Ochsner, *et al.* 1994).

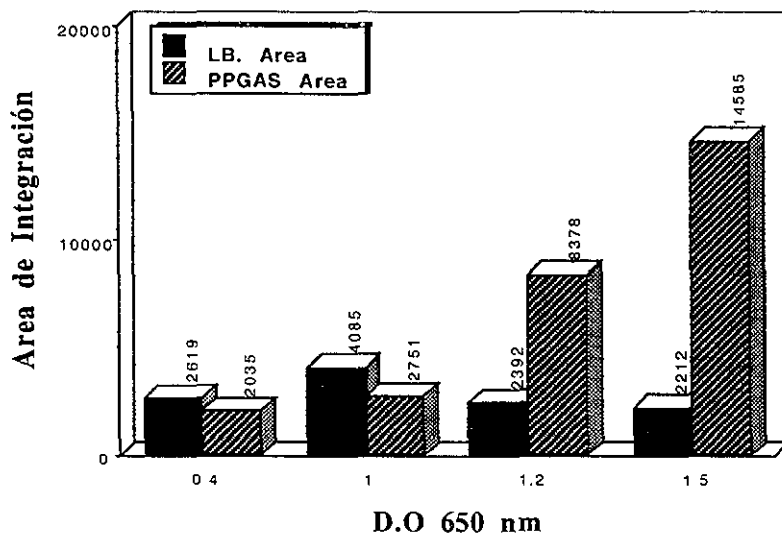
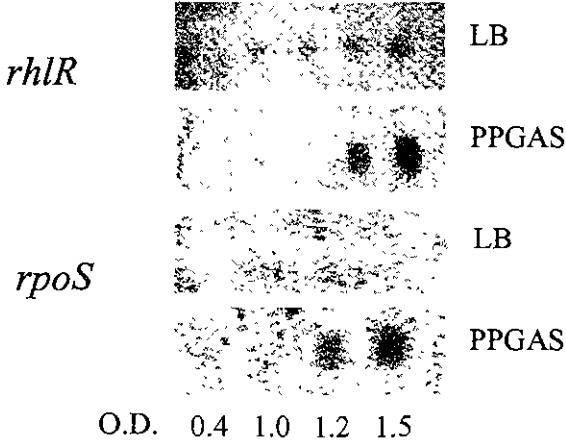


Figura 13. Análisis del transcrito del gen *rmlB* mediante “Dot blot” a lo largo de la curva de crecimiento.

Con el fin de determinar si la transcripción de los genes *rml* se incrementa con la densidad óptica debido a la concentración celular o a la fase de crecimiento se realizó un análisis de “dot blot” de los genes *rpoS* y *rhIR* a diferentes densidades ópticas en medio PPGAS y LB. Observamos que el gen *rhIR* presenta una transcripción basal durante toda la curva de crecimiento en medio LB (Fig. 14), mientras el nivel de transcrito en medio PPGAS sufre un incremento drástico en densidades ópticas altas. Estos resultados concuerdan con las observaciones de Pearson, *et al*; 1997; quienes encuentran el mismo efecto en medio con una fuente de nitrógeno mala. En el caso del gen *rpoS* el nivel de transcrito también se incrementa a densidades ópticas altas en medio de privación de fosfatos en comparación con el medio LB (Fig. 14). Estos resultados demuestran que la transcripción tanto de *rhIR* y

A)



B)

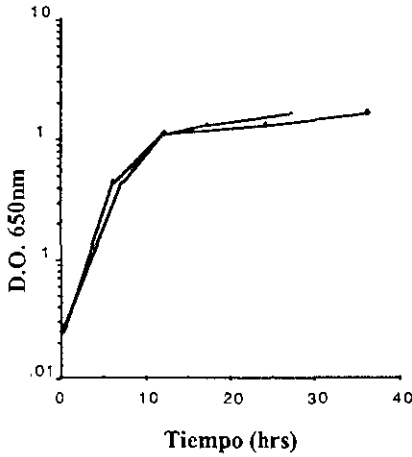


Figura 14. Análisis del transcrito de los genes *rhIR* y *rpoS* mediante hibridación DNA-RNA durante la curva de crecimiento. A) Análisis de “Dot blot” de los genes *rhIR* y *rpoS*. B) Curva de crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 en medio LB y en PPGAS.

rpoS, como de los genes *rml*, se afecta por la privación de nutrientes y no solo dependen de la concentración celular.

La síntesis de la TDP-L-ramnosa depende del sistema “quorum sensing” RhIR

La síntesis de ramnolípidos se regula por el sistema “quorum sensing” RhIR, que activa los genes blanco cuando la densidad celular es alta. Para determinar si este sistema también regula la síntesis de la TDP-L-ramnosa, nosotros determinamos la actividad enzimática de la TDP-glucosa-4,6-deshidratasa (enzima codificada por el gen *rmlB*, primer gen del operón) en la mutante 65E12 afectada en el gen *rhIR* y en la cepa silvestre PG201. Observamos una disminución de la actividad enzimática de 90% en comparación a la cepa silvestre (calculada en UI/mg de proteína). Así mismo, la síntesis de ramnolípidos se encuentra completamente abatida en la mutante 65E12 (Tabla 5). Estos resultados sugieren que la síntesis de la TDP-L-ramnosa es afectada por el sistema “quorum sensing” RhIR.

Algunos de los genes regulados por los activadores transcripcionales de la familia Lux poseen corriente arriba del inicio de la transcripción un secuencia consenso de activación denominada caja lux (Fuqua, *et al.* 1996). En la región corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción de los genes *rml* no se encontró ninguna secuencia parecida a la caja lux. Por lo que queda por determinarse el nivel de la regulación y si la activación es directa o indirecta.

Tabla 5. Producción de ramnolípidos y actividad enzimática de TDP-glucosa-4,6-deshidratasa en diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

CEPA	Actividad Enzimática (UI)	Ramnolípidos (µg/ml)
PAO1	1470	126
PAO1 <i>rpoS</i> ::Gm	540	178
PG201	417	166
65E12 (<i>rhlR</i> -)	71	ND

ND: No Detectado

El factor sigma S no interviene en la transcripción del operón *rml*.

Latifi, *et al.* 1996, demostraron que el gen *rpoS* que codifica para el factor sigma S, está bajo la activación del sistema “quorum sensing” RhIR. Estos antecedentes aunados a los resultados obtenidos, así como al tipo de promotor encontrado corriente arriba del gen *rmlB* que parecía responder tanto a sigma S como a sigma 70, sugerían que el factor sigma S podía estar involucrado en el aumento de la transcripción de estos genes en fase estacionaria. Con el objetivo de verificar esta hipótesis construimos una mutante *rpoS* mediante una inserción de un cassette de gentamicina. Se analizó la producción de ramnolípidos y la actividad enzimática de la dTDP-glucosa-4,6-deshidratasa. La actividad enzimática de la TDP-glucosa-4,6-deshidratasa (Tabla 5) en esta mutante disminuye en 63%, lo que sugiere que el factor sigma S interviene en la síntesis de la dTDP-L-ramnosa en *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, esta disminución no se ve reflejada en los

niveles de ramnolípidos (Tabla 5). Estos resultados demuestran que las enzimas Rml no son las enzimas limitantes en la síntesis de ramnolípidos.

Con el fin de demostrar si sigma S es el factor que participa en la transcripción de los genes *rml* se realizaron análisis de “dot blot” en la cepa afectada en *rpoS* y en la cepa PAO1 en donde se observó que la concentración del transcrito del gen *rmlB* disminuye un 23% en la mutante *rpoS* (Fig. 15). Estos resultados demuestran que el factor sigma S tiene un papel minoritario en la transcripción de los genes *rml*, y que afecta la actividad enzimática a través de otros factores regulatorios.

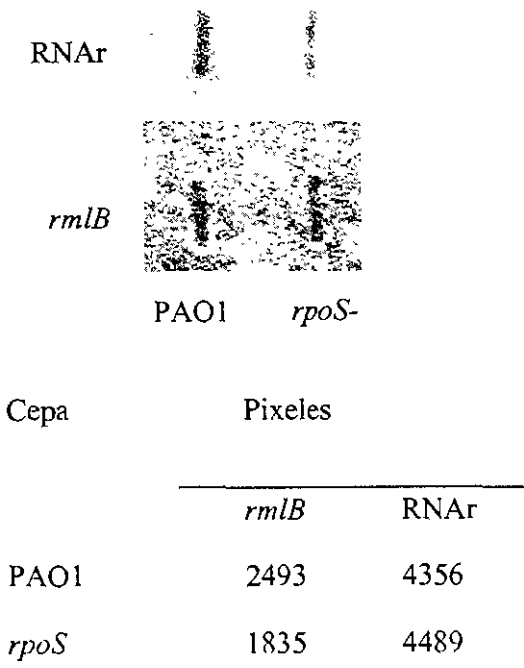


Figura 15. Análisis del transcrito del gen *rmlB* mediante “Dot blot” en la mutante *rpoS*.

Modelo de regulación del operón *rml* en *Pseudomonas aeruginosa*.

Con todos los datos recavados hasta el momento, podemos proponer que la regulación de la síntesis de la TDP-L-ramnosa de *Pseudomonas aeruginosa* depende del sistema “quorum sensing” Rhl, como lo sugiere la disminución de un 90% en la actividad de la enzima RmlB (TDP-glucosa-4,6-deshidratasa) en la mutante 65E12 (*rhlR*-). Sin embargo, se desconoce a que nivel RhlR afecta la síntesis de la dTDP-L-ramnosa en *Pseudomonas aeruginosa*. Los análisis obtenidos de la región promotora sugerían que esta regulación podría ser a través del factor sigma S (*rpoS*), sin embargo los análisis de los niveles de transcripción de los genes *rml* en la mutante *rpoS* (Fig 14) demuestran que el promotor encontrado no responde al factor sigma S. Los análisis realizados demuestran que la regulación de este operón no es a través del factor sigma S, sino que existen otros factores regulatorio que afecta la actividad de la enzima TDP-glucosa-4,6-deshidratasa que depende del sistema Rhl o que posiblemente el mismo RhlR regule directamente estos genes (Fig 16).

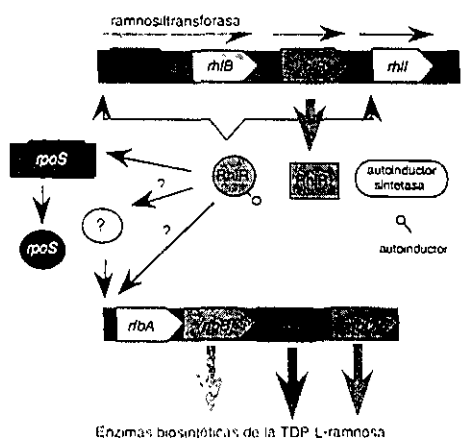


Figura 16. Modelo de regulación de los genes *rml* en *Pseudomonas aeruginosa*.

CONCLUSIONES

El gen *algC* participa en la síntesis de la dTDP-L-ramnosa, y por lo tanto en la síntesis de LPS y ramnolípidos.

La actividad de *algC* no es el factor limitante en la síntesis de ramnolípidos.

Las proteínas del operón *alg* no están involucradas en la síntesis de LPS ni de ramnolípidos.

Los genes *rmlBDAC* codifican para enzimas biosintéticas de la dTDP-L-ramnosa.

La transcripción del operón *rml* presenta un aumento dramático en la fase estacionaria de crecimiento en medio con deprivación de fosfatos.

El sistema “quorum sensing” RhlR esta involucrado en la síntesis de la TDP-L-ramnosa

El factor transcripcional sigma S no interviene en la transcripción del operón *rml*.

Existe otro u otros factores regulatorios dependientes de “quorum sensing” que afectan la síntesis de la dTDP-L-ramnosa.

PERSPECTIVAS

Determinar que otros factores regulatorios afectan la síntesis de TDP-L-ramnosa.

Determinar si la activación del sistema *rhIR* sobre los genes *rmIBDAC* es directa o indirecta.

Determinar si la activación del sistema *rhIR* sobre los genes *rmIBDAC* es transcripcional o postranscripcional.

Determinar si existe regulación por retroalimentación en la vía biosintética de la dTDP-L-ramnosa.

Comprobar que el aumento en la concentración de ramnosa modifica el equilibrio en la producción de mono y diramnolípido.

Referencias

- Alexeyev, M.F. Shokolenko, I.N. Croughan T.P. 1995 Improved Antibiotic-resistence gene cassettes and omega elements for Escherichia coli vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene*. 160: 63-67.
- Brnt, 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 Dec*;177(24):7155-63
- Burger, M. M., Glaser, L. and Burton, R. M. (1963). The enzymatic synthesis of rhamnose-containing glycolipids by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 238, 2595-2602.
- Burrows LL, Charter DF, Lam JS. 1996. Molecular characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5 (PAO1) B-band lipopolysaccharide gene cluster. *Mol Microbiol Nov*;22(3):481-95
- Cabrera Valladares N. 2000. Sobreproduccion de dTDP-L-ramnosa y su efecto en la síntesis de ramnolipidos en *E. coli* recombinante. Tesis de Licenciatura. UAEM.
- Chakrabarty, A.M. 1996. Microbial degradation of toxin chemicals: evolutionary insights and practical considerations. *ASM news*. 62:130-137.
- Chandrasekaran, E. V., and Bemiller, J. N. (1980). Constituent analyses of glycosaminoglycans. *Methods Carbohydr. Chem.* 8, 89-96.
- Clark, B. R. and Whitfield C. 1992 Molecular cloning of the *rfb* region of *Klebsiella Pneumoniae* serotype O1:K20. The *rfb* gen cluster is responsible for synthesis of the D-galactan I O polysaccharide. *J. Bacteriol.* 174(14):4614-4621.
- Clementi F. 1998. Alginate production by *Azotobacter vinelandii*. *Crit. Rev. Biotech.* 17:327-361.
- Chitnis, C. E., and Ohman, D. E. (1993). Genetic analysis of the alginate biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas aeruginosa* shows evidence of an operon structure. *Mol. Microbiol.* 8, 583-590.
- Costerton, J. W. (1980). *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease, p. 15-24. In C. D. Sabath (ed.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland.
- Coyne, M. J., Jr. Russell, K. S. Coyle, C. L. and Goldberg, J. B. (1994). The *Pseudomonas aeruginosa* *algC* gene encodes phosphoglucomutase, required for the synthesis of complete lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.* 176, 3500-3507
- Drazins A. Chakrabarty A. 1984. Cloning of genes controlling alginate biosynthesis from a mucoid cystic fibrosis isolated of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 159:9-18.
- Dasgupta T, de Kievit TR, Masoud H, Altman E, Richards JC, Sadovskaya I, Speert DP, Lam JS. 1994. Characterization of lipopolysaccharide-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* derived from serotypes O3, O5, and O6. *Infect Immun Mar*;62(3):809-17
- Deretic, V., Schurr, M. J. Boucher, J. C. and Martin, D. W. (1994). Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidly in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by

- alternative sigma factors. *J. Bacteriol.* 176: 2773-2780.
- Fiechter, A. 1992. Biosurfactant: moving towards industrial application. *Trends biotechnol.* 10:208-217.
- Fuqua C, Winans SC, Greenberg EP. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol*;50:727-51
- Fuqua, C. and Greenber,E.P.1998. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactone.*Curr. Opin. Microbiol.* 1(2):183-189.
- Glaser L. and S. Kornfeld. 1961. The enzymatic synthesis of thymidine-linked sugar.*J.Biol.Chem.* 263(6)1795-1799.
- Glaser, L. 1963. Biosynthesis of deoxysugars. *Physiological reviews.* 43(2):215-242.
- Goethals K, Leyman B, Van Den Eede G, Van Montagu M, Holsters M. 1994. An *Azorhizobium caulinodans* ORS571 locus involved in lipopolysaccharide production and nodule formation on *Sesbania rostrata* stems and roots. *J Bacteriol Jan*;176(1):92-9
- Goldberg, J. B., Gorman, W. L., Flynn, J. L., and Ohman, D. E. (1993) A mutation in *algN* permits *trans* activation of alginate production by *algT* in *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* 175, 1303-1308.
- Goldberg J.B., Hatano, K. Pier, G.B. 1993. Synthesis of lipopolisaccharide O side chains by PAO1 requires the enzyme phosphomanomutase. *J. Bacteriol* 175(6):1605-1611.
- Goldberg, J. B., Coync, M. J. Jr., Neely, A. N. and Holder, I. A. (1995). Avirulence of a *Pseudomonas aeruginosa algC* mutant in a burned-mouse model of infection. *Infect. Immun.* 63, 4166-4169.
- Greenberg, E. Peter. 1997. Qurum sensing in gram negative bacteria. *ASM News.* 63 (7):371-377.
- Guerra-Santos, L. Kappeli, O. FietcherA. 1986. Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and enviromental factors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24:443-448.
- Hangge-Aronis R. 1996. Regulation of gene expression during entry into stationary phase. *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and molecular biology. ASM press. 1497-1512.
- Hatano, K., Goldberg, J. B. and Pier, G. B. (1993). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: evidence that the O side chains and the common antigens are on the same molecules. *J. Bacteriol.* 175, 5117-5128.
- Hauser G. and M. L.Karnovsky 1958. Studies on the biosynthesis of L-rhamnose. *J. Biol. Chem.* 233(2)287-291.
- Hershberger, C. D., Ye, R. W, Parsek, M R., Xie, Z.-D., and Chakrabarty, A. M. (1995) The *algT* (*algU*) gene of *Pseudomonas aeruginosa*, a key regulator involved in alginate biosynthesis, encodes an alternative s factor (*s^f*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7941-7945.
- Hobbs M and Reeves P.R. 1994 The Jump start a 39bp element common to several polisaccharide

gene cluster. *Mol. Microbiol.* 12(5):855-856.

Holloway, B.W., V. Krishnapillai, and A.F. Morgan. 1979. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* 43:73-102.

Jarvis F.G. and Johnson, M.J. 1949. a glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.* 71:4124-4126.

Jiang, X. M. Neal B. Santiago, F. Lee S.J. romana L.K. and Reeves P.R. 1991. Structure and sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar *typhimurium* (strain LT2). 5(3):695-713.

Klena JD, Schnaitman CA. 1994. Genes for TDP-rhamnose synthesis affect the pattern of lipopolysaccharide heterogeneity in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 176(13):4003-10

Knirel, Yuriy A. 1990. Polysaccharide antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 17(4): 273-304.

Koch AK, Kappeli O, Fiechter A, Reiser J. 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J. Bacteriol.* 173(13):4212-9

Koplin R., Wang G., Hotte B., Priefer U. and A. Puhler. 1993. A 3.9-Kb DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* that is necessary for lipopolysaccharide production encodes a set of enzymes involved in the synthesis of the dTDP-rhamnose. *J. Bacteriol.* 175:7786-7794.

Kolter, R. D.A. Siegele and A. torma. 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:855-874.

Lam, J., Chan, R. Tam, K. and Costerton, J. W. (1980). Production of mucoid micro-colonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect. Immun.* 28, 546-556.

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

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.

Llorca, L. R. Barreto, R. León, S. Moreno, J. Martínez-Salazar, G. Espin, G. Sobrón. 1996. Genetic analysis of the transcriptional arrangement of *Azotobacter vinelandii* alginate biosynthetic genes: identification of two independent promoters. *Mol. Microbiol.* 21:449-457.

Loewen, P.C., and R. Hengge-Aronis. 1994. the role of the sigma factor σ^{s} (katF) in bacterial global regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:53-80.

Lightfoot, J., and Lam, J. S. (1993). Chromosomal mapping, expression and synthesis of lipopolysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*: a role for guanosine diphosphate (GDP)-D-mannose. *Mol. Microbiol.* 8, 771-782

Liu, P. V., Matsumoto, H., Kusama, H., and Bergan, T. (1983) Survey of heat-stable major somatic

antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 256-264.

Macpherson D.F., P.A. Manning and R. Morona. 1994. Characterization of the dTDP-rhamnose biosynthetic genes encoded in the *rfb* locus of *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol. 11:281-292.

Macpherson D.F., P.A. Manning and R. Morona. 1995. Genetic analysis of the *rfbX* gene of *Shigella flexneri*. Gene. 155:9-17.

Marolda CL, Valvano MA. 1993. Identification, expression, and DNA sequence of the GDP-mannose biosynthesis genes encoded by the O7 *rfb* gene cluster of strain VW187 (*Escherichia coli* O7:K1). J Bacteriol Jan;175(1):148-58.

Marumo, K., Lindqvist L., Verma M., A. Wientraub, P.R. Reeves and A.A. Lindberg. 1992. Enzymatic synthesis and isolation of the thymidine diphosphate-6-deoxy-D-xylo-4-hexulose and thymidine diphosphate-L-rhamnose. Eur. J. Biochem. 204:539-545.

May, T. B. and Chakrabarty, A. M. (1994). *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. Trends Microbiol. 2, 151-157.

McClure, C. D., and Schiller, N. L. (1992) Effects of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on human monocyte-derived macrophages. J. Leukocyte Biol. 51, 97-102.

Miller, R., M.L., Brisseau and Ch. G. Soberón. 1992. Biosurfactant-enhanced remediation of metal-contaminated soil. Project.

Mohr, C. D. and Deretic, V. (1990) Gene-scrambling mutagenesis: generation and analysis of insertional mutations in the alginate regulatory region of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 172, 6252-6260.

Mohr C. D., Hibler, N. S., and Deretic, V. (1991) AlgR, a response regulator controlling mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*, binds to the FUS sites of the *algD* promoter located unusually far upstream from the RNA start site. J. Bacteriol. 173, 5136-5143.

Nicas, T. I., and Iglewski, B. H. (1985). The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Can. J. Microbiol. 31, 387-392

Núñez, C. Moreno, S. Soberón-Chavez, G. and G. Espín 1999. The azotobacter vinelandii response regulator *algR* is essential for cyst formation. J. Bacteriol. 181(1):141-148.

Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J 1994. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol Apr;176(7):2044-54.

Ochsner UA, 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 Aug 5;269(31):19787-95

Ochsner UA, Reiser J 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A Jul 3;92(14):6424-8

Ochsner, U A., J. Reiser, A. Fiechter and B. Witholt. 1995. Production of *Pseudomonas aeruginosa*

rhamnolipid biosurfactants in heterologous hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3503-3506.

Pearson JP, Passador L, Iglewski BH, Greenberg EP. 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* Feb 28;92(5):1490-4

Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol Sep*;179(18):5756-67

Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH. 1997. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol May*;179(10):3127-32

Pesci EC, Iglewski BH. 1997. The chain of command in *Pseudomonas* quorum sensing. *Trends Microbiol Apr*;5(4):132-4; discussion 134-5

Pier, G. D. (1985). Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J. Infect. Dis.* 151, 575-580.

Rehm B.H.A. and S. Valla. 1997. Bacterial alginates: biosynthesis and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48:281-288.

Rendell, N.B. Taylor, G.W. Somerville, M. Todd, H. Wilson, R. Cole P.J. 1990. Characterisation of *Pseudomonas* rhamnolipids. 1045:189-193.

Rick, D.P. 1996 Lipopolysaccharide Biosynthesis. *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and molecular biology. ASM press. 648-663.

Robertson BD, Frosch M, van Putten JP. 1994 .The identification of cryptic rhamnose biosynthesis genes in *Neisseria gonorrhoeae* and their relationship to lipopolysaccharide biosynthesis. *J Bacteriol Nov*;176(22):6915-20

Rocchetta, H. L., Pacan, J. C., and Lam, J. S. 1998. Synthesis of the A-band polysaccharide sugar D-rhamnose requires Rmd and WbpW: identification of multiple AlgA homologues, WbpW and ORF488, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 29, 1419-1434.

Rocchetta, H. L., Burrows L.L., and Lam, J. S. 1999. Genetics of O-Antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(3):523-553.

Salmond G.P.C., Bycroft B W., Stewart G.S.A.B. and P. Williams. 1995. Micro Review, The bacterial 'enigma': cracking the code of cell-cell communication . *Mol. Microbiol.* 16:615-624.

Sambrook, J., Fritsch, E. F and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Suh, S. Silo-Suh, L. Woods, D.E. Hasset D.J. West S.E.H. and Ohman D.E. 1999 Effect of *rpoS* mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* . *J. Bacteriol.* 181(13):3890-3897

Tanaka, K. Takanayagi, Y. Fujita, N. Ishihama, A. Takahashi, H. 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci* 90.3511-3515.

Tanaka, K Takahashi, H. 1994 cloning analysis and expression of a *rpoS* homologue gene from

Pseudomonas aeruginosa PAO1. Gene. 150:81-85.

Wild, M, Caro, A. D. Miller, R. M. and Soberón-Chávez, G. (1997). Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. FEMS Microbiol. Lett. 153, 279-285.

Zelinski, N. A., Chakrabarty, A. M. and Berry, A. (1991). Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa algC* gene encoding phosphomannomutase J. Biol. Chem. 266, 9754-9763.

Zhang, Y. and Miller, R. M. (1992) Enhancement of octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* 58:3276-3282.

Zhang, L., Al-Handy A., P. Toivanen and M. Skurnik. 1993. Genetics organization and sequence of the *rfb* gene cluster of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3: similarities to the dTDP-rhamnose biosynthesis pathway *Salmonella* and to the bacterial polysaccharide transport systems. Mol. Microbiol. 9:309-321.

Zhou, X., George, E., Frank, D. W. Utley, M. Gilmour, I. Krogfelt, K. A. Claxton, L. D. Laux, D. C. and Cohen, P. S. (1997). Isolation and characterization of an attenuated strain of *Pseudomonas aeruginosa* AC869, a 3,5-dichlorobenzoate degrader. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1389-1395.