



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUIMICA

Estudio de la interacción de las proteínas
RhIR y LasR de *Pseudomonas aeruginosa*
con su secuencia blanco de DNA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS.

P R E S E N T A :

Biol. Alejandra Abigail González Valdéz

DIRECTOR: Dra. Gloria Soberón Chávez



México, D.F. Diciembre, 2006.



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.

Agradezco profundamente la participación de los miembros del Comité Tutorial, por todas y cada una de las observaciones hechas a este trabajo:

**Dra. Eida Guadalupe Espin
Instituto de Biotecnología, UNAM.**

**Dr. Juan Enrique Morett
Instituto de Biotecnología, UNAM.**

**Dra. Gloria Soberón Chávez
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

De igual manera quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por concederme la beca de maestría para la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Gloria Soberón por la dedicación y empeño que tuvo en la realización de este trabajo.

A los doctores Sergio Sánchez, Amelia Farres, Guadalupe Espin, Jorge Membrillo y Enrique Morett, por las sugerencias para la mejora de esta tesis.

A la M. en C Marisela Aguirre por todos los conocimientos y enseñanzas brindadas en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio; los que están y los que se fueron: Alonso, Alsino, Fabiola, Francisco, Dr. Humberto, Jeiry, Luz Maria, Marisela, Mauricio Natalia y Virginia.

A Leticia Garcia por su invaluable trabajo que realiza en el postgrado.

A mis amigos del laboratorio de la Dra. Maria Elena Flores: Alfredo, Sara T. Y Fermin.

Finalmente mis más profundo y sincero agradecimiento a la persona que estuvo la noche anterior al termino de este trabajo y sobre todo al pedacito de vida que lleva por nombre María José.

INDICE

INDICE DE TABLAS

INDICE DE FIGURAS

Resumen

1. Introducción

1.1 Respuesta sensora de quórum.

1.2 Respuesta sensora de quórum en *Vibrio fischeri*.

1.3 Respuesta sensora de quórum en *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Antecedentes

2.1 Especificidad de las cajas *las*.

2.2 Regulación Transcripcional por LasR.

2.3 Regulación Transcripcional por RhlR.

2.4 Regulación Transcripcional por QscR.

2.5 Sistemas de Represión.

3. Hipótesis

4. Objetivo General

4.1 Objetivos específicos

5. Estrategia experimental

6. Materiales y Métodos

6.1 Construcción de los promotores artificiales.

6.2 Transferencia de las fusiones del plásmido al genoma.

6.3 Efecto de los reguladores en la expresión de la fusión.

6.4 Construcción de pUCMR.

7. Resultados y discusión

7.1 Construcción de los promotores artificiales.

7.2 Represión del gene *lacZ* por la unión de RhIR a la caja las de *rhIA*.

7.3 Interacción de la proteína Mal-R con la caja las de *rhIA*.

7.4 Interacción de las proteínas LasR y QscR con la caja las de *rhIA*.

7.5 Interacción de LasR y RhIR a la caja las de *rhIR*.

7.6 Interacción de las proteínas LasR y RhIR a cajas las mutantes derivadas de la caja de *rhIR*.

7.7 Interacción de LasR y RhIR a la caja las de *phzA1*.

8. Conclusiones

9. Perspectivas

10. Referencias

INDICE DE TABLAS

TABLA 1 Homólogos de LuxI/LuxR y funciones regulada por el sistema sensorio de quórum.

TABLA 2. Cajas las

TABLA 3 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. **Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum**
- Figura 2. **Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum en *Vibrio fischeri*.**
- Figura 3. **Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum en *P. aeruginosa*.**
- Figura 4. **Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum en *P. aeruginosa* por el regulador LasR**
- Figura 5. **Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum en *P. aeruginosa* por el regulador RhlR**
- Figura 6. **Modelo del promotor artificial para medir la interacción de las proteínas reguladoras de la respuesta sensora de quórum de *Pseudomonas aeruginosa* a distintas cajas *las*.**
- Figura 7. **Modelo de recombinación homóloga para obtener las fusiones en el cromosoma.**
- Figura 8. **Actividad β -galactosidasa en función de la densidad celular durante el crecimiento de la cepa MC4100 conteniendo la fusión cromosomal (*rhlA-lacZ*)**
- Figura 9. **Actividad β -galactosidasa en función de la densidad celular durante el crecimiento de la cepa MC4100 conteniendo el plásmido pRS551 con la fusión (*rhlA-lacZ*) y en la JV1065.**
- Figura 10. **Efecto de RhlR, en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja *las* de *rhlA* (barras en cuadros) con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100.**
- Figura 11. **Efecto de represión de *lacZ* por RhlR, en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja *las* de *rhlA* (barras en cuadros).**
- Figura 12. **Efecto de Mal-R en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja *las* de *rhlA* (barras negras) con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100.**

Figura 13. Efecto de represión de *lacZ* por Mal-R, en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3-C₁₂ sobre la caja las de *rhIA* (barras negras).

Figura 14. Efecto de represión de *lacZ* por RhIR (barras en cuadros) y de Mal-R (barras negras), en presencia de los autoinductores C₄-HSL y C₁₂-HSL sobre la caja las de *rhIA* (barras negras).

Figura 15. Efecto de LasR (barras blancas) y QscR (barras moteadas) en presencia del autoinductor 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las de *rhIA* con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100.

Figura 16. Efecto de RhIR (barras en cuadros) y LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las de *rhIR* con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100.

Figura 17. Efecto de represión de *lacZ* por RhIR (barras en cuadros), LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL, sobre la caja las de *rhIR*.

Figura 18. Efecto de RhIR (barras en cuadros) y LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las de *rhIRa* con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100

Figura 19. Efecto de represión de *lacZ* por RhIR (barras en cuadros), LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las *rhIRa*.

Figura 20. Efecto de RhIR (barras en cuadros) y LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄ y C₁₂ sobre la caja las de *rhIRb* con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100

Figura 21. Efecto de RhIR (barras en cuadros) y LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las de *phzA1* con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100.

Figura 22. Efecto de represión de *lacZ* por RhIR (barras en cuadros), LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄ y C₁₂ sobre la caja las de *phzA1*.

RESUMEN.

Pseudomonas aeruginosa es una γ proteobacteria ampliamente distribuida en la naturaleza. Además, es un patógeno de individuos inmuno-comprometidos (oportunistas) y es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística. La expresión de los genes regulados por la respuesta sensora de quórum (QS) en *Pseudomonas aeruginosa* depende de la síntesis de dos autoinductores (AI), el butanoil-homoserin lactona (C_4 -HSL) y el 3-oxo-dodecanoil-homoserin lactona (3O- C_{12} -HSL) que al unirse a su regulador transcripcional, RhIR y LasR respectivamente, activan la transcripción de diversos genes. RhIR promueve la expresión, entre otros, de los genes involucrados en la síntesis de ramnolípidos (rhlAB). En ausencia de C_4 -HSL, RhIR puede actuar como represor de algunos genes como rhlR, rhlA y lasB (elastasa B). El objetivo del presente trabajo fue evaluar los cambios en la unión de la proteína RhIR a cajas las de diferentes genes regulados por ella, en presencia de uno o ambos autoinductores; así como también la interacción que pueda tener con los otros dos reguladores LasR y QscR.

Se construyó la fusión transcripcional cromosomal ϕ (pZrhlA-lacZ) con dos oligos con la secuencia de 19 pares de bases de la caja las del operón rhlAB y su complementaria flanqueada con las secuencias -10 y -35 del promotor consenso de lacZ, utilizando la cepa MC4100. Para determinar la unión de la proteína RhIR a las diferentes cajas se cuantificó la actividad de β -galactosidasa de la fusión en presencia de un plásmido que tiene el gene rhlR bajo un promotor inducible y en presencia de diferentes concentraciones de C_4 -HSL o 3O- C_{12} -HSL. Este modelo nos sirvió para estudiar la unión de los reguladores LasR y QscR a otras cajas las.

En este trabajo se evaluó la interacción in vivo de RhIR y LasR a distintas cajas las. Se encontró que RhIR interacciona con y sin C_4 -HSL o 3-O- C_{12} -HSL a la caja las de rhlA, en concordancia con lo encontrado mediante geles de retardamiento, pero no interacciona a las cajas rhlR1 o phzA1, esta última interacciona específicamente con el regulador LasR/3-O- C_{12} -HSL.

1. INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una γ proteobacteria ampliamente distribuida en la naturaleza debido a su habilidad de adaptación por lo que se puede aislar de una gran variedad de fuentes como suelos, agua someras y ambientes marinos así como en aguas residuales, tejidos de animales y plantas. Es capaz de utilizar un amplio espectro de compuestos orgánicos como fuente de alimento, habilidad que le permite colonizar nichos ecológicos, donde los nutrientes son escasos para otro tipo de microorganismos. Su gran versatilidad radica en la diversidad funcional de su genoma (6.3 Mpb de la cepa PAO1), el cual contiene significativamente más familias de genes de distinto origen que otros genomas como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium tuberculosis* (Stover *et al.*, 2000). *P. aeruginosa*, además, es un patógeno oportunista de humanos y resiste de manera natural a una gran cantidad de antibióticos y desinfectantes. Es el principal causante de muerte en pacientes con fibrosis quística y un patógeno importante en pacientes inmuno-comprometidos. Puede también causar bacteremia en pacientes con quemaduras graves, infectar el tracto urinario cuando se utilizan catéteres y causar neumonía en pacientes que utilizan respiradores artificiales (Bodey *et al.*, 1983). Todas las cepas conocidas de esta bacteria son potencialmente patógenas para el hombre. Por otro lado, *P. aeruginosa* es importante desde el punto de vista biotecnológico debido a que es capaz de degradar una gran variedad de compuestos orgánicos, tales como hidrocarburos alifáticos, compuestos aromáticos y solventes halogenados (Poole *et al.*, 2001).

Los compuestos tóxicos y enzimas hidrolíticas que intervienen en la infección, degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos e interfieren con el funcionamiento del sistema inmune (Doring *et al.*, 1987; Nicas e Iglewski, 1985). Las cepas mucoides (aquellas que producen grandes cantidades del exopolisacárido alginato) se seleccionan a medida que progresa la infección del tracto respiratorio de

pacientes que tienen fibrosis quística. Como se mencionó antes, este tipo de infecciones es el factor principal de mortalidad en estos pacientes ya que las cepas mucoides son resistentes a antibióticos y no son eliminadas por el sistema inmune del paciente.

Otra característica que presenta *P. aeruginosa* es la capacidad que tiene de adherirse a superficies en ambientes acuosos y formar biopelículas. Esta estructura confiere a las bacterias que la forman, tanto cooperatividad fisiológica y metabólica como protección frente a los cambios del medio circundante; esto es, las biopelículas son más resistentes a los antibióticos, detergentes y desinfectantes que las células aisladas de los mismos microorganismos (Costerton *et al.*, 1994). Las biopelículas representan un problema de salud e industrial. En el primer caso contaminan dispositivos que se implantan dentro del cuerpo como válvulas cardíacas y dispositivos intrauterinos. En la industria causan problemas en el proceso de producción debido a que provocan taponamiento y corrosión en conexiones y filtros (Costerton *et al.*, 1994).

Sin embargo, a la vez que *P. aeruginosa* presenta distintos problemas al hombre, esta bacteria tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental. Se sabe que es uno de los pocos organismos capaces de degradar alcanos de cadena ramificada (Schaeffer *et al.*, 1979), que produce biosurfactantes que son útiles para la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos (Maier y Soberon-Chávez, 2000) o con metales pesados (Miller, R. M.1995), y que produce enzimas, como la lipasa (Martinez y Soberon-Chávez, 2001).

P. aeruginosa secreta durante la fase estacionaria de crecimiento numerosos compuestos que están involucrados en su patogénesis, como ramnolípidos, enzimas hidrolíticas y toxinas. La expresión de dichos factores depende de una respuesta colectiva rápida y eficaz para la colonización del huésped, dicho fenómeno se conoce como respuesta sensora de quórum (Fuqua *et al.*, 2001).

1.1 Respuesta sensora de quórum.

La respuesta sensora de quórum (Fig.1) es un sistema de comunicación intercelular por medio de pequeñas moléculas denominadas autoinductores, que son producidas por las propias bacterias hasta alcanzar una concentración crítica, cuando interactúa con reguladores transcripcionales específicos; permitiendo así sensar la densidad celular de la población circundante y responder coordinadamente modificando el patrón de expresión genética (Fuqua *et al.*, 2001). Existen distintos tipos de autoinductores, siendo comunes aminoácidos o péptidos cortos en bacterias Gram positivas y acilados de homoserin lactonas, quinolonas o furanosil borato di éster en bacterias Gram negativas (Kleerebezen *et al.*,1997; Whitehead *et al.*, 2001).

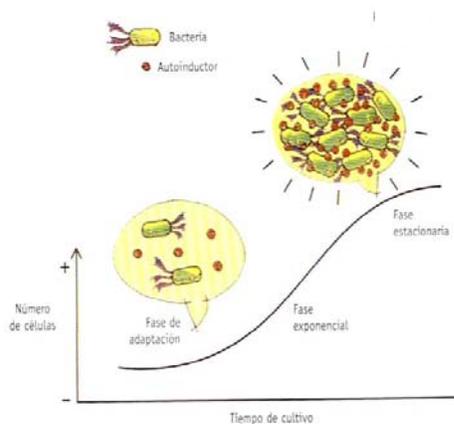


Figura. 1 Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum, a partir del aumento del número de células y de la concentración del autoinductor. Tomado de Soberon-Chávez

Existe toda una familia de reguladores transcripcionales que responden a este mecanismo. A continuación se muestran algunos en la Tabla 1

Tabla 1

| Organismo | Autoinductor Sintetasa | Regulador Transcripcional | Funciones Reguladas |
|--|------------------------|---------------------------|--|
| <i>Vibrio fischeri</i> | LuxI | LuxR | Bioluminiscencia |
| <i>Aeromonas hidrofila</i> proteasas | Ahyl | AhyR | metal proteasas serin |
| <i>Aeromonas salmonicida</i> | Asal | AsaR | exoproteasas |
| <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | Tral | TraR | conjugación |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | CepI | CepR | Producción de sideróforos |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | Cvill | CviR | antibióticos, violaceína. |
| <i>Enterobacter agglomerans</i> | Eagl | EagR | desconocido |
| <i>Erwinia</i> exoproteínas, <i>carotovora</i> | Expl | ExpR | Síntesis de antibióticos |
| <i>Erwinia</i> (Regulador de <i>crisanthemi</i> pectinasas) | Carl | CarR | pecS síntesis de |
| <i>Erwinia</i> polisacá- <i>stewartii</i> | Esal | EsaR | Biosíntesis de ridos capsulares |
| <i>Escherichia coli</i> | Desconocido | SdiA | división Celular |
| <i>Pseudomonas aerofaciens</i> | PhzI | PhzR | <i>phz</i> (biosíntesis de fenacinas) |
| <i>Ralstonia solanacerum</i> | SoiI | SoiIR | Desconocido |
| <i>Rhizobium etli</i> | RaiI | RaiIR | Número de nódulos |
| <i>Rhodobacter bacteriana</i> <i>sphaeroides</i> | CerI | CerR | Agregación |

Tabla 1. Organismos que poseen homólogos de LuxI/LuxR y funciones reguladas por el sistema sensorio de quórum. Tomada de Miller y Bassler., 2001.

1.2 Respuesta sensora de quórum en *Vibrio fischeri*.

El sistema detector de quórum, fue descrito inicialmente como un regulador de la bioluminiscencia en la bacteria marina *Vibrio fischeri* (Nealson, 1977). Cuando ésta se encuentra viviendo como simbiote en órganos especializados de algunos peces o calamares (donde alcanza alta densidad celular), se induce la producción de luciferasa, otorgando protección a su huésped contra depredadores al eliminar su sombra creada por la luz de la luna (Visick y McFall-Ngai, 2000). El gen *luxI* codifica para la autoinductor sintetasa, los genes *luxA* y *luxB* codifican para la luciferasa *luxG* codifica para una flavin reductasa, en tanto *luxC*, *luxD* y *luxE*, codifican para un complejo multienzimático responsable de la síntesis de aldehído, el cual es utilizado por la luciferasa. Corriente arriba de este operón y transcrito divergentemente, se encuentra el gen *luxR* que codifica para un regulador transcripcional responsable de la activación de la expresión de los demás genes *lux* al interactuar con el autoinductor *N*-3-oxo-hexanoilhomoserin lactona (OHHL) (Whitehead et al., 2001).

La inducción de bioluminiscencia por *V. fischeri* se dispara por la acumulación del autoinductor OHHL, sintetizado por LuxI. Cuando la densidad celular es alta, el autoinductor alcanza una concentración umbral e interactúa con LuxR, provocando un cambio conformacional en la proteína que le permite unirse a una secuencia específica de 20 pb denominada caja lux, con la secuencia 5'-ACCTGTAGGATCGTACAGGT-3', centrada a -40 pb del inicio de la transcripción de *luxI*. El complejo LuxR/OHHL unido a la caja lux interacciona con la RNA polimerasa (RNA-P) y activa la transcripción del operón *luxICDABEG* (Devine et al., 1989; Greenberg, 1997). Este mecanismo de autoinducción permite la activación transcripcional del operón que codifica tanto funciones de bioluminiscencia como de síntesis de OHHL llevando a una producción continua de luz (Fig. 2). Cuando la concentración del autoinductor es muy alta, LuxR reprime la transcripción de su propio gene, lo cual provee de

una autolimitación al sistema, ya que se requiere de una cantidad de energía considerable para la producción de bioluminiscencia que no es conveniente gastar si no se encuentran condiciones adecuadas (Shadel y Baldwin, 1991).

Este sistema "sensor de quórum" sólo depende de la densidad celular y no de la composición del medio de cultivo, por lo que se supone que se expresa siempre que se alcanza una elevada densidad de bacterias.

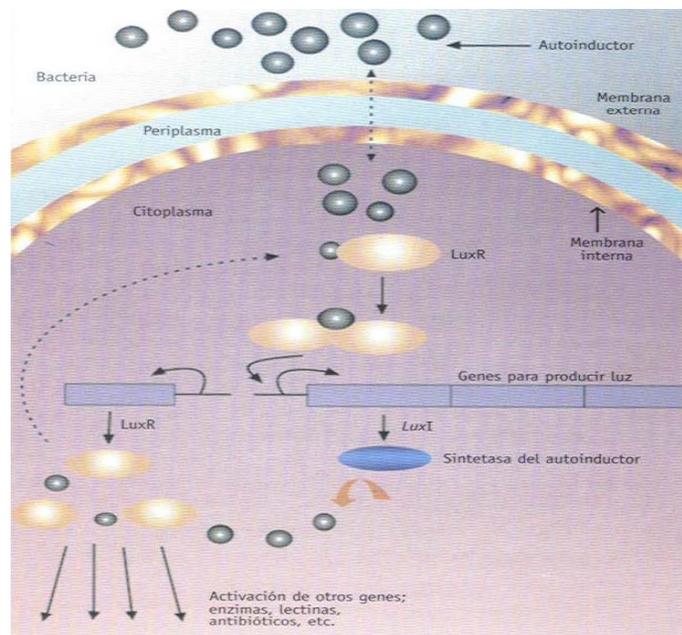


Figura 2. Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum en *Vibrio fischeri*. El autoinductor difunde del medio extracelular hacia el citoplasma y se une a LuxR, este dimeriza y regula la expresión de operón de *luxICDABEG*. Tomada de Soberón-Chávez.

1.3 Respuesta sensora de quórum en *Pseudomonas aeruginosa*.

Como se mencionó anteriormente, varios factores de virulencia de *P. aeruginosa*, están regulados por una respuesta sensora de quórum

similar a la de *V. fischeri* (Van Delden e Iglewski, 1998). Existe una correlación entre este tipo de regulación y el hecho que para el establecimiento de una infección se requiere una cierta densidad poblacional.

La respuesta sensora de quórum en *P. aeruginosa* está controlada por tres reguladores homólogos al regulador de la respuesta sensora de quórum de *V. fischeri* (LuxR) y depende de la producción y secreción de dos autoinductores; 3-oxo-dodecanoilhomoserina lactona (3O-C₁₂-HSL) y butanoilhomoserina lactona (C₄-HSL). Estos autoinductores interactúan con LasR y RhIR respectivamente y juntos regulan la expresión genética ya sea activando o reprimiendo alrededor del 6% de su genoma (Fig. 3; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Por otra parte, recientemente se reportó que el regulador transcripcional QscR, homólogo de LuxR, interactúa con el autoinductor 3O-C₁₂-HSL (Lee *et al.*, 2006) y reprime o activa cientos de genes, algunos de ellos también regulados por LasR y RhIR (Lequette *et al.*, 2006). La respuesta sensora de quórum en *P. aeruginosa* es mucho más compleja que en *V. fischeri*, no solo por los múltiples genes involucrados sino también porque esta respuesta es modulada por factores medioambientales (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). Las proteínas reguladoras se unen a secuencias llamadas cajas las muy parecidas en secuencia a la caja lux. De hecho LasR reconoce la caja lux y LuxR la caja las del gene *lasB* (Gray *et al.*, 1994). Sin embargo, no está claro cómo es esta interacción, ni cómo se determina la especificidad por una secuencia dada.

Como se mencionó anteriormente, existe un tercer regulador llamado QscR, el cual se ha visto que ejerce un efecto negativo sobre la expresión de genes productores de piocianina y cianida de hidrógeno; blancos que son regulados por los otros dos reguladores, sin embargo se desconoce su mecanismo de acción sobre estos genes (Chugani *et al.*, 2001, Ledgham *et al.*, 2003).

Dos de los tres reguladores actúan de manera jerárquica; el primer regulador es LasR que unido al autoinductor 3O-C₁₂-HSL activa la transcripción de los genes que codifican para proteasas (elastasa A y B), hemolisinas (fosfolipasa C), la exotoxina A y la 3O-C₁₂-HSL sintetasa (LasI). LasR activa al gene del segundo regulador, RhIR, que al unirse al autoinductor C₄-HSL, a su vez activa la transcripción de los genes que sintetizan la ramnosiltransferasa 1 (*rhlAB*), entre otros (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

Se ha observado que la respuesta sensora de quórum puede activarse por otra señal química distinta a las mencionadas, la 3,4-hidroxi-2-heptylquinolina, llamada también PQS (Pesci *et al.*, 1999) la cual se ha propuesto que es una molécula que une a los sistemas *las* y *rhl* (McKnight *et al.*, 2000). Sin embargo, se desconoce si esta molécula interactúa con los reguladores LasR y RhIR y cómo lo lleva a cabo (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

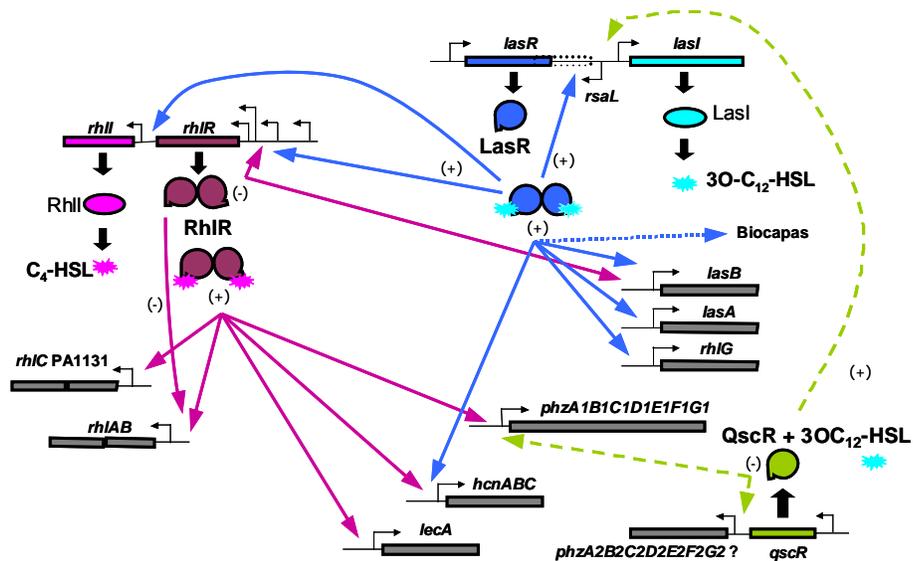


Figura 3. Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum en *P. aeruginosa*. (+) significa activación de la expresión, (-) significa represión. Las flechas continuas indican que existe evidencia experimental entre las proteínas reguladoras y los genes, no ocurriendo esto para las líneas punteadas. Tomado de Soberón-Chávez *et al.*, 2005

2. ANTECEDENTES

2.1 Especificidad de las cajas *las*.

En general, los promotores que responden a reguladores transcripcionales de la familia LuxR, contienen una secuencia inversa repetida de 18 a 20 pares de bases, centrada aproximadamente a -40 pb del inicio de la transcripción (Stevens *et al.*, 1994; Pesci *et al.*, 1997). Esta secuencia posee el consenso CT-N₁₂-AG, pero fuera de las bases invariables no se sabe cuáles son las bases importantes para la especificidad de unión de las diferentes proteínas reguladoras (Whiteley *et al.*, 1999).

Las cajas *las* pueden ser reguladas por LasR, RhIR o por ambos reguladores transcripcionales, y los cambios que existen entre estas cajas pueden representar grandes diferencias en la afinidad del regulador (De Kievit *et al.*, 2002; Whiteley and Greenberg, 2001). En la Tabla 2 se muestran algunas de estas cajas *las* y sus características.

Tabla 2 CAJAS LAS

| Gene | secuencia caja las | Regulador | Referencia |
|---|----------------------|-----------|----------------------------------|
| <i>rsaL</i> 1999 | AACTAGCAAATGAGATAGAT | L | De Kievit <i>et al.</i> , |
| <i>qsc-104</i> (PA2592) 1999 | AACTACCAGTTCTGGTAGGT | L | Whiteley <i>et al.</i> , |
| <i>lasI</i> 1995 | ATCTATCTCATTGCTAGTT | L | Seed <i>et al.</i> , |
| <i>lasA</i> | TACTGGAAAAGCTGATAGTT | L | Toder <i>et al.</i> , 1994 |
| <i>lasB</i> OP2 | ACCTGCTTTTCTG-CTAGCT | L | Rust <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>rhIR-2</i> 2003a | CCCTCGCCCCACGACCAGTT | L | Medina <i>et al.</i> , |
| <i>qsc-102</i> (PA1897) <i>al.</i> , | ACCTGCCCGGAAGGGCAGGT | L | Whiteley <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>rhIR-1</i> 2003a | ATCTGCGCGCTTG-ACAGCG | L | Medina <i>et al.</i> , |
| <i>rhIG</i> 1998 | ATCTGTGCATTGCCGCAGTA | L | Campos <i>et al.</i> , |
| <i>lecA</i> 2000 | TCCTGCATGAATTGGTAGGC | LR | Winzer <i>et al.</i> , |
| <i>hcnA</i> Hass,2000 | ACCTACCAGAATTGGCAGGG | LR | Pessi y |
| <i>rhIA</i> 1997 | TCCTGTGAAATCTGGCAGTT | LR | Pearson <i>et al.</i> , |
| <i>qsc-117</i> (PA1869) 1999 | CACTGCCAGATCTGGCAGTT | LR | Whiteley <i>et al.</i> , |
| <i>lasB</i> OP1 | ACCTGCCAGTTCTGGCAGGT | LR | Rust <i>et al.</i> , 1996 |
| <i>rhII</i> 2002 | CCCTACCAGATCTGGCAGGT | LR | De Kievit <i>et al.</i> , |
| <i>phzA1</i> 1999 | ACCTACCAGATCTTGTAGTT | LR | Whiteley <i>et al.</i> , |
| <i>qsc-126</i> (PA3327) 1999 | ACCTAACAGATTTGTAAGTT | LR | Whiteley <i>et al.</i> , |
| <i>qsc-132</i> (PA4217) 1999 | CCCTACGCGGCCTTGGAGCC | LR | Whiteley <i>et al.</i> , |
| <i>rhII</i> S2b | | | |

Tabla 2. Secuencia de las cajas las de genes regulados por LasR (L) o por LasR/RhIR (LR). Los nucleótidos en negritas son las bases invariables mientras que las bases que están subrayadas son aquellas diferencias que se encuentran comparadas con la secuencia *rhIA*. Tomada de soberón-Chávez *et al.*, 2005.

Salvo en casos contados (Medina *et al.*, 2003c; Schuster *et al.*, 2004b; Lee *et al.*, 2006), no existe evidencia directa de la unión de las proteínas reguladoras a determinada caja las. La información que se presenta en la Tabla 2, por tanto, representa en su mayoría datos indirectos basados en similitud de secuencia y en patrones de regulación en mutantes de *P. aeruginosa* en genes de la respuesta sensora de quórum o en su expresión en *Escherichia coli* en presencia de un determinado regulador y autoinductor. Es claro, pues, que para varias de las cajas las no hay datos de unión directa de ninguna de las proteínas y que lo que se ha predicho de la especificidad en la mayoría de los casos es basado en datos indirectos.

Por otra parte, como se puede observar en esta tabla, existen genes regulados por la respuesta sensora de quórum, tales como *lasB* (Rust *et al.*, 1996), *hcnA* (Pessi y Haas., 2000) y *rhIR* (Medina *et al.*, 2003a) que tienen dos cajas las funcionales. En el caso de *lasB* y *hcnA* una de estas cajas juega un papel principal en la activación transcripcional (Anderson *et al.*, 1999; Pessi y Haas, 2000; Rust *et al.*, 1996). Mientras que para el gene *rhIR* LasR/3O-C₁₂-HSL se une a la primera caja (las box-1) y activa su expresión y para la segunda caja (las box-2) este mismo regulador tiene un efecto negativo (Medina *et al.*, 2003a).

Whiteley *et al.*, en 1999, mediante una selección por mutagénesis de genes regulados por la respuesta sensora de quórum, postuló las características de las cajas las llamadas tipo L y las llamadas tipo LR (Tabla 2). Aquellas cajas que fueron activadas por LasR/3O-C₁₂-HSL (L) presentaban la secuencia 5'-NCTN₁₂AGNN-3' donde las letras en negritas son bases invariables. Sin embargo, esto no siempre se cumple ya que Medina *et al* en el 2003a y Rust *et al* en 1996 reportaron que cajas con 11 en lugar de 12 nucleótidos entre los sitios consenso son también funcionales y son reconocidos por LasR/3O-C₁₂-HSL. Por otra parte, las cajas las que son reconocidas por ambos reguladores presentan la siguiente secuencia NNCTN₃AN₄TN₃AGNN. Cabe señalar que esta regla

tampoco es invariable ya que la caja las de *lecA* no tiene la adenina conservada en la posición 8. Asimismo se sabe que aunque las cajas llamadas LR pueden ser reconocidas tanto por LasR/3O-C₁₂-HSL como por RhIR/C₄-HSL lo hacen con distinta especificidad. Por ejemplo RhIA es activado por LasR/3O-C₁₂-HSL sólo en un 10% de lo que lo hace por RhIR/C₄-HSL (Pearson *et al.*,1997; Medina *et al.*, 2003c), mientras que el caso de *lasB* es el contrario, siendo mayor la especificidad por LasR/3O-C₁₂-HSL (Pearson *et al.*,1997). No se sabe qué determina la especificidad por cada uno de los reguladores en el caso de las cajas las LR. Para verificar la especificidad de los reguladores Whiteley y Greenberg, hicieron mutagénesis dirigida y midieron los cambios en la activación transcripcional, encontrando que, cuando se introduce una adenina en la posición 8 y una timina en la posición 13 de las cajas las tipo-L, los genes que la presentan son activados por RhIR/C₄-HSL además de por LasR/3O-C₁₂-HSL.

2.2 Regulación Transcripcional por LasR.

Kiratisin *et al.*, en el 2002, usando la interacción con la proteína LexA, demostraron que LasR es un activador transcripcional que sólo lleva a cabo su función cuando está acompañado con el autoinductor 3O-C₁₂-HSL y formando multímeros (Fig. 4). Este mecanismo de dimerizarse se ha observado también en otros reguladores transcripcionales de la respuesta sensora de quórum como es LuxR en *V. fischeri* (Egland y Greenberg, 2000; Urbanowski *et al.*, 2004).

Latifi *et al.*, en 1996; Pesci *et al.* (1997) y Medina *et al.* (2003b) demostraron que la expresión de *rhIR* depende de LasR/3O-C₁₂-HSL utilizando fusiones transcripcionales *rhIR::lacZ* en una mutante *lasR*. Sin embargo, este complejo no sólo activa el gene *rhIR* sino que promueve la transcripción de los genes *rhIG* (Campos-Garcia *et al.*,1998); involucrado en la vía de biosíntesis de ramnolípidos, elastasas A y B, así como otras

proteasas (De Kievit e Iglewski, 2000; Smith e Iglewski, 2003; Toder *et al.*, 1994; van Delden e Iglewski, 1998; Whiteley *et al.*, 1999) de *rhII* (De Kievit *et al.*, 2002) y *lasI* (Seed *et al.*, 1995) genes que codifican para las sintetasas de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL, respectivamente. Por otro lado, Pesci *et al.* (1997) encontraron que en el fondo genético de *E. coli* el autoinductor 3O-C₁₂-HSL bloquea la unión del C₄-HSL a RhlR, lo cual inhibe la expresión de *rhIA*.

Recientemente, Schuster *et al.*, (2004b) purificaron la proteína LasR y evaluaron su unión a diferentes promotores. Encontraron que esta proteína efectivamente es un dímero en presencia del 3O-C₁₂-HSL, y que se une específicamente a las cajas las de ciertos genes, como se había inferido por los datos *in vivo*, pero sorprendentemente esta proteína se unió a otras secuencias que no habían sido identificadas por medios genéticos y que no son del tipo de las cajas las conocidas.



Figura 4. Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum en *P. aeruginosa* por el regulador LasR. LasR regula positivamente diferentes cajas las sólo cuando esta acomplejado con el autoinductor y formando dímero (izquierda) mientras que en forma de monomero y en ausencia del autoinductor no se une a dichas cajas (derecha). Tomado de Soberón-Chávez *et al.*, 2005

2.3 Regulación Transcripcional por RhlR.

La proteína RhIR promueve la transcripción de genes que codifican para la producción del biosurfactante ramnolípido, tales como el operón *rhIAB*, que codifica para la ramnosiltransferasa 1 (Ochsner *et al.*, 1994) y *rhIC* que codifica para la ramnosiltransferasa 2 (Rahim *et al.*, 2001). Se ha reportado que otros metabolitos que también participan en la virulencia de la bacteria, como la piocianina, están también bajo el control del sistema RhIR (Whiteley *et al.*, 1999). Así pues, Whiteley *et al* en el (2001), usando mutantes de *P. aeruginosa* en los genes que codifican para las sintetetasas de 3O-C₁₂-HSL (*lasI*) y C₄-HSL (*rhII*), sugiere que el operón *phz1* (que codifica para las enzimas que intervienen en la síntesis de piocianina) es regulado principalmente por RhIR/C₄-HSL, pero no se ha determinado directamente la actividad de LasR/3O-C₁₂-HSL.

Medina *et al* (2003c) demostraron mediante geles de retardo la capacidad de RhIR de unirse a la caja las de *rhIA*, en presencia o ausencia de C₄-HSL; además, estos mismos autores, mediante la técnica de footprinting *in vivo*, en el fondo genético de *E. coli* demostraron la interacción directa de RhIR con la caja las en presencia y ausencia del autoinductor C₄-HSL, y proponen que para el primer caso RhIR es un activador y en ausencia del autoinductor RhIR es un represor.

La unión de RhIR a la caja las no se ve afectada por el 3O-C₁₂-HSL (Medina *et al.*, 2003c). Sin embargo, Pesci y colaboradores (1997) mediante una fusión $\Phi(rhIA-lacZ)$ observaron que la interacción de RhIR con este autoinductor compite la unión del C₄-HSL y disminuye su actividad de activador transcripcional. Actualmente se desconoce el mecanismo mediante el cuál esta interacción con el 3O-C₁₂-HSL afecta la actividad transcripcional de RhIR. (Fig. 5). Asimismo RhIR en ausencia del autoinductor C₄-HSL reprime la expresión de *lasB* (Anderson *et al.*, 1999) y de su propio gen *rhIR* (Medina *et al.*, 2003a).

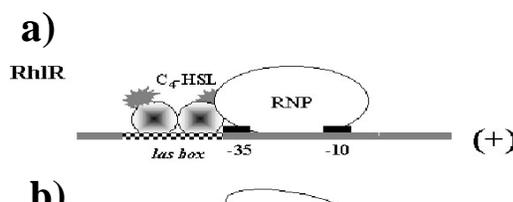


Figura 5. Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum en *P. aeruginosa* por el regulador RhIR. RhIR en presencia del C₄-HSL activa diferentes cajas las (a), en ausencia del C₄-HSL reprime diferentes cajas las (b) dicho regulador interactúa con el 3O-C₁₂-HSL y desplaza al autoinductor C₄-HSL. Tomado de Soberón-Chávez *et al.*, 2005

A diferencia de LasR, RhIR no ha sido purificado por lo que existe gran controversia sobre el estado oligomérico del regulador en ausencia del autoinductor. Ventre *et al* (2003), mediante estudios de anisotropía con la proteína verde fluorescente, demuestran que RhIR sin el autoinductor es un dímero, mientras que Lamb *et al* (2003) usando la interacción con la proteína LexA, demostraron que en estas condiciones RhIR es un monómero.

La Dra. Katy Juárez construyó dos proteínas de fusión de RhIR. Fusionó por un lado, el gen *rhIR* al gen que codifica para la tiorredoxina resultando la proteína pThio-R y por otro lado el gen *rhIR* con el que codifica para la proteína de unión a maltosa para dar la proteína pMal-R, esto con la finalidad de obtener anticuerpos y purificar el regulador. Como primer paso, realizó ensayos de β -galactosidasa con la fusión $\Phi(rhIA-lacZ)$ para ver si estas proteínas fusionadas eran funcionales; para el caso de pThioR, se formaron cuerpos de inclusión, por lo que no fue probada su actividad y sólo se usó para hacer anticuerpos (Medina *et al.*, 2003c), mientras que pMal-R activó la fusión, pero a muy bajos niveles.

2.4 Regulación Transcripcional por QscR.

QscR es un homólogo de LuxR que se encontró por el análisis del genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (Chugani *et al.*, 2001). Se sabe que el autoinductor con el que interactúa es el 3-O-C₁₂-HSL. Recientemente se purificó esta proteína y se determinó que se une a cajas las con la secuencia 5'-ACCTGCCCG GAAGCGCAGGT-3' y se encuentra en la posición -54 del inicio de transcripción (Lee *et al.*, 2006).

Chugani *et al.*, en el 2001, mediante una mutante en el gen *qscR*, y fusiones transcripcionales de $\Phi(\textit{phzABC-lacZ})$, $\Phi(\textit{hcnAB-lacZ})$, $\Phi(\textit{lasI-lacZ})$, $\Phi(\textit{lasB-lacZ})$ observó que la mutante produce un incremento en la expresión de algunos factores de virulencia como piocianina, cianida de hidrógeno, la sintetasa del autoinductor 3O-C₁₂-HSL y la elastasa B y en la expresión de los genes que los codifican. Sin embargo, el mecanismo de represión se desconoce ya que ninguno de estos genes tiene en su región regulatoria secuencias a las que se une QscR.

2.5 Sistemas de Represión.

Muchos activadores transcripcionales pueden funcionar como represores de promotores artificiales, simplemente con la unión del activador al DNA ya sea sobrelapando o posicionando río abajo de la región de unión de la RNA polimerasa, de tal manera que esta unión (activador-DNA) puede separarse de su interacción con la RNA polimerasa y medirse *in vivo*.

Egland y Greenberg (2000) y Von Bodman *et al.* (2003), utilizando este sistema de represión estudiaron a LuxR, regulador de los genes de luciferasa en *V. fischeri*, EsaR regulador de la síntesis de polisacárido exocapsular en *Pantoea stewartii* y ExpR_{Ecc} regulador de síntesis de pectinasas en *Erwinia carotovora*. El sistema consistió en clonar corriente arriba del operón lacZYA, las cajas TTGACA y TATAAT

espaciadas con la secuencia de la caja lux. Demostraron para todos los casos que en presencia del regulador y su respectivo autoinductor la expresión transcripcional del gene *lacZ* se redujo considerablemente.

Es interés del laboratorio de la Dra. Gloria Soberón, y el objetivo de esta tesis, estudiar la interacción directa de los reguladores transcripcionales de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes cajas las *in vivo*. Para ello planteamos la siguiente hipótesis y los siguientes objetivos.

3. Hipótesis

La especificidad en la interacción de las proteínas RhlR, LasR y QscR a cajas *las* es regulada por los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL.

4. Objetivos General:

Estudiar la regulación transcripcional de las proteínas RhlR, LasR y QscR a diferentes cajas *las* de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.1 Objetivos específicos:

- 1) Construir una fusión transcripcional artificial $\Phi(pZrhIA-lacZ)$ que permita detectar la interacción de las proteínas LasR, RhlR y QscR in vivo, usando la caja *las* del operón *rhlAB*.
- 2) Determinar la interacción de RhlR, LasR y QscR a la fusión transcripcional $\Phi(pZrhIA-lacZ)$ en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3 O-C₁₂-HSL.
- 3) Estudiar los cambios en la interacción de RhlR, LasR y QscR a cajas *las* de diferentes genes regulados por ellas, así como a cajas *las* que presenten mutaciones.

5. Estrategia experimental.

Para estudiar la interacción directa de las proteínas reguladoras LasR, RhIR y QscR de la respuesta sensora de quórum de *P. aeruginosa*, a las cajas *las* para los genes *rhIA*, *rhIR* y *phzA1* se diseñó un sistema que permitiera medir esta interacción (DNA-Regulador), haciendo un promotor artificial. Este promotor artificial se diseñó clonando corriente arriba del operón *lacZYA*, la caja -35 (TTGACA) y -10 (TATAAT) espaciadas con la secuencia de las cajas *las* de los genes arriba mencionados. Como se mencionó anteriormente, las cajas *las* constan de 20 pares de bases, pero en nuestro diseño experimental incluimos únicamente 19, ya que en la gran mayoría de las cajas la última base es una T que coincide con la primera T de la secuencia -10 del promotor.

En ausencia de las proteínas reguladoras la actividad de β -galactosidasa sería nuestro 100% (Figura 6A). Esto ya que no habría algún impedimento para que la polimerasa se uniera a los sitios consenso -10 y -35 y transcribiera el gen *lacZ*. Mientras que en el caso donde hubiera regulador (Figura 6B) la actividad β -galactosidasa disminuiría por el impedimento que ejerce el regulador al interaccionar con su caja *las*. De tal forma que con dicho sistema podríamos determinar *in vivo*, qué regulador interacciona directamente a las cajas *las* y cómo los autoinductores modulan esta interacción.

Las fusiones transcripcionales con los promotores artificiales fueron transferidos del plásmido pRS551 al cromosoma de *Escherichia coli* para tener este promotor en una copia y poder introducir a estas células un plásmido que codificara para la proteína reguladora a evaluar, sin tener problemas de incompatibilidad entre los plásmidos o de que codificaran la misma resistencia a antibióticos (Fig. 7).

En el modelo que desarrollamos, la interacción de una proteína reguladora a su secuencia de DNA blanco se infiere de la reducción de la

actividad de la enzima β -galactosidasa expresada por las fusiones en presencia del regulador, por lo que se mide como la proporción de represión de una fusión transcripcional *lacZ* insertada en el cromosoma de *E. coli*.

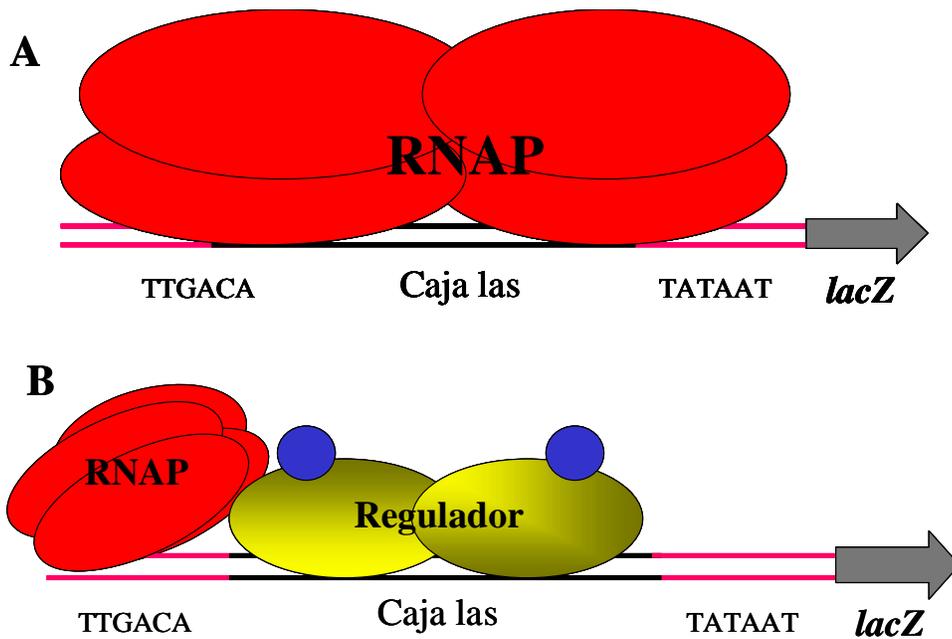


Figura 6. Modelo del promotor artificial para medir la interacción de las proteínas reguladoras de la respuesta sensora de quórum de *Pseudomonas aeruginosa* a distintas cajas *las*.

6. Materiales y Métodos

6.1 Construcción de los promotores artificiales.

Para construir las fusiones transcripcionales artificiales \square (*rhIA-lacZ*), \square (*pZrhIR-lacZ*) y \square (*pZphzA1-lacZ*) se diseñaron para cada una de ellas dos oligonucleótidos complementarios con la secuencia de 19 pares de bases de la caja las del operón *rhIAB*, *rhIR* y *phzA1* y su complementaria flanqueada con las secuencias -10 (TATAAT) y -35 (TTGACA) del promotor del gene *lacZ* (Tabla 3). En los extremos de estas secuencias se incluyeron secuencias de reconocimiento para las enzimas *EcoR1* y *BamH1*. Estas secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción no son complementarias en los dos oligonucleótidos, sino que quedan algunas bases no apareadas, como sería el producto después de que las enzimas hubieran hecho el corte de un DNA de doble cadena. Dichos oligonucleótidos se hibridarán 1:1, siguiendo los ciclos de temperatura similar al que se lleva a cabo para una reacción de PCR en un termociclador BioRad, para evitar la formación de productos mal apareados. El producto del apareamiento se observó en un gel de agarosa al 3% para verificar que se obtuviera una banda correspondiente al DNA de doble cadena formado por la hibridación de los dos oligonucleótidos. Los híbridos de doble cadena se clonaron en los sitios *EcoR1*- *BamH1* del plásmido pRS551 (Tabla 3), el cual se electrotransformó con un electroporador (BioRad) en la cepa Top10 (Tabla 3). Las transformantes se seleccionaron en cajas con ampicilina (200 μ g/ml) y 40 μ g/ml de (X gal). Las colonias azules resultantes se purificaron estriando dos veces una colonia aislada y de ellas se purificó el plásmido mediante un kit de QUIAGEN, según las instrucciones del fabricante. Los plásmidos obtenidos fueron secuenciados con el oligo lacZrev (Tabla 3) en un secuenciador automático ABI PRISM.

6.2 Transferencia de las fusiones del plásmido al genoma.

Con el fin de obtener las fusiones transcripcionales en una sola copia insertada en el cromosoma, se transformó químicamente la cepa Te2680 (Tabla 3) con el plásmido derivado del pRS551 que contiene el promotor artificial digerido con la endonucleasa *Xho*1. La estrategia general para hacer estas inserciones se muestra en la Figura 7 y se describe brevemente a continuación. Las transformantes se seleccionaron en kanamicina (50 μ g/ml). Las colonias sensibles a ampicilina y cloranfenicol pero resistentes a kanamicina y con un fenotipo azul fueron las que llevaban la fusión en el genoma. La cepa con dicha se infectó con el fago P1_{vir} y se obtuvo un lisado de fagos con el que se infectó a la cepa Lac-MC4100 y se obtuvieron colonias transductantes con una copia de las fusiones \square (*rhIA-lacZ*), \square (*pZrhIR-lacZ*) ó \square (*pZphzA1-lacZ*) en el cromosoma bacteriano.

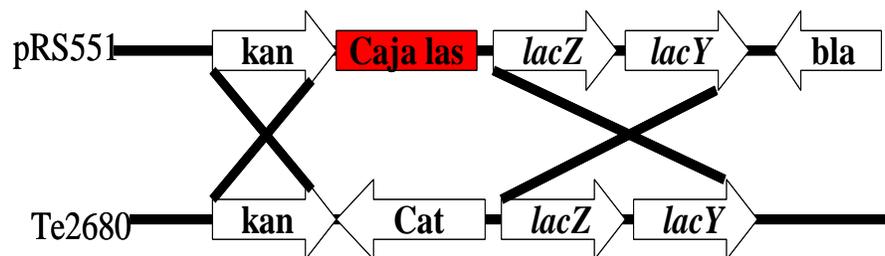


Figura 7. Modelo de recombinação homóloga para obtener las fusiones en el cromosoma.

Posteriormente, dichas fusiones se transformaron químicamente con derivados del plásmido pUCP20 que llevan clonados los genes que codifican para los reguladores transcripcionales LasR, RhIR ó QscR y como control se transformó el plásmido pUCP20 sin inserto. Los genes que codifican para estos reguladores están bajo el promotor *lacZ*. La cepa

que lleva la fusión $\Phi(rhIA-lacZ)$ se transformó también con el plásmido pUCMR (Tabla 3), que es un derivado de pUCP20 que codifica para la proteína de fusión Mal-R. Todas las cepas transformantes que llevan un plásmido que expresa uno de los reguladores transcripcionales se seleccionaron con ampicilina (resistencia del plásmido pUCP20) y kanamicina (resistencia insertada con la fusión transcripcional en el cromosoma; Fig. 7) en presencia de X-gal. Las resistentes a ambos antibióticos fueron las candidatas en las que se evaluó la unión de los reguladores a los promotores artificiales.

6.3 Efecto de los reguladores en la expresión de la fusión.

Para determinar el efecto de los reguladores transcripcionales LasR, RhIR ó QscR a las cajas las de operón *rhIAB*, *rhIR* y *phzA1* se cuantificó la actividad de β -galactosidasa según la técnica descrita por Miller (1992).

Las cepas con las fusiones cromosomales y los plásmidos que codifican para los reguladores, o con el vector, fueron crecidas por 12 horas en medio LB (1% de triptona, 5% de extracto de levadura, 1% de NaCl, pH 7) líquido a 37°C, 200 rpm conteniendo ampicilina y kanamicina. Las cepas fueron entonces reinoculadas por dilución 1:100 en 10ml del mismo medio y sometidas bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación hasta 1.5 (fase estacionaria) de densidad óptica a 600nm (OD_{600}). Para inducir la expresión de los reguladores y observar su efecto sobre las fusiones la cepa se incubó con 1mM de Isopropil β -D-thiogalactopiranosido (IPTG) y para observar el efecto de los autoinductores en la interacción al DNA de la proteína reguladora, se incubó en presencia de 10 μ M de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL además se incubó en presencia de ambos IPTG/C₄-HSL e IPTG/3O-C₁₂-HSL, como control se utilizó 10 ml de LB sin adicionarle IPTG o algún autoinductor y fueron sometidas bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación. Se consideró el 100% de actividad de β -

galactosidasa, la que expresó la cepa con la fusión transcripcional en el cromosoma en presencia del vector pUCP20, crecida en las mismas condiciones que las cepas que llevan los plásmidos que expresan los reguladores RhIR, LasR o QscR (pGMYC, pMT1 y pQscR, respectivamente; Tabla 3)

6.4 Construcción de pUCMR.

El plásmido pUCMR se construyó subclonando el fragmento *malE-rhIR* del plásmido pMal-R. Se digirió el plásmido pMal-R (Tabla 3) con *Pst1-Ssp1* (invitrogene), obteniendo una banda de aproximadamente 1.3 kb que corresponde al fragmento *malE-rhIR*. Dicho fragmento se limpió mediante el kit de Quiagen y se clonó en los sitios *Pst1-Sma* (invitrogene) del vector pUCP20. Se transformó por electroporación en la cepa Top10 y se seleccionó en cajas suplementadas con ampicilina y X-gal. Las colonias blancas fueron las que tenían el fragmento clonado. Para verificar la clonación, el plásmido pUCMR se purificó utilizando el kit de QUIAGEN, según las instrucciones del fabricante y se digirió con la endonucleasa *EcoR1* (invitrogene).

Estadística. Las actividades de β -galactosidasa se analizarón con el progrma excell 2000 obteniendo el promedio y desviación standart del triplicado de cada condición.

Tabla 3 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

| Cepas, plásmido, Oligonucleotidos o Fagos. | Características relevantes | Referencias |
|--|---|------------------------|
| Cepas MC4100 Bachmann, B.J.1972 | F ⁻ , araD139 Δ(argF-lacU169) <i>rpsL150</i> <i>thiA1 relA1 fib5301 deoC ptsF25 rbsR</i> | |
| JV1065 1995 | Derivada <i>rpoS::Tn10</i> de la cepa MC4100 | Visick y Clarke |
| Top 10 | F, <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)Φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL (Str^r) endA1 nupG</i> | Invitrogen |
| Te2680 | <i>recD(recD::Tn10d-Tet)</i> | Elliott T., 1992 |
| Plásmidos pRS551 1987 | Vector para construir fusiones <i>lacZ</i> transcripcionales, Amp ^r | Simons <i>et al.</i> , |
| pUCP20 <i>al.</i> , 1994b | Vector de clonación con <i>plac</i> , Amp ^r | West <i>et</i> |
| pMal-R Juárez | Vector para expresar proteínas de fusión con MBP con un inserto de <i>rhIR</i> . | Dra. Katy |
| pMT1 <i>al.</i> , 2003b | pUCP20 expresando <i>lasR</i> bajo <i>plac</i> | Medina <i>et</i> |
| pGMYC <i>et al.</i> , 2003b | pUCP20 expresando <i>rhIR</i> bajo <i>plac</i> | Medina |
| pQscR | pUCP20 expresando <i>qscR</i> bajo <i>plac</i> | Este trabajo |
| pUCMR | pUCP20 expresando <i>mal-rhIR</i> bajo <i>plac</i> | Este trabajo |
| Oligonucleótidos <i>rhIA</i> forward | 5' AATTCTTGACATCCTGTGAAATCTGGCAGT TATAATG-3' | Este trabajo |
| <i>rhIA</i> reverse trabajo | 5' GATCCATTATAACTGCCAGATTCACAGGATTGTCAAG-3' | Este |
| <i>rhIR</i> forward | 5' AATTCTTGACAATCTGCGCGCTTGACAGCGTATAATG-3' | Este trabajo |
| <i>rhIR</i> reverse trabajo | 5' GATCCATTATACGCTGTCAAGCGCGCAGATTGTCAAG-3' | Este |
| <i>phzA1</i> forward trabajo | 5' AATTCTTGACAACCTACCAGATCTTGTAGTTATAATG-3' | Este |
| <i>phzA1</i> reverse trabajo | 5' GATCCATTATAACTACAAGATCTGGTAGGTTGTCAAG-3' | Este |
| <i>lacZrev</i> Membrillo | 5' ATCGGTTGTCCTTCGCCGCTGCG-3' | Dr.Jorge |

Fago
P1_{vir}

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En *Pseudomonas aeruginosa* LasR, RhIR y QscR son reguladores transcripcionales que juegan un papel fundamental en la respuesta sensora de quórum. Estas proteínas regulan la expresión de diferentes genes uniéndose directamente a las denominadas cajas las. Sin embargo, salvo en casos contados, no existe evidencia directa de la unión de las proteínas reguladoras a determinadas cajas las. De aquí la importancia de medir la unión *in vivo* de estas proteínas a diferentes cajas las.

7.1 Construcción de los promotores artificiales.

Se construyó un promotor artificial posicionando las cajas *rhIA*, *rhIR* o *phzA1* entre los consensos -35 y -10. Este promotor fue clonado corriente arriba del operón *lacZYA* en la cepa de *E. coli* MC4100, como se describe en la sección de material y métodos (Fig 6). Dichas fusiones se transformaron con los plásmidos que codifican para las proteínas reguladoras LasR, RhIR, QscR, ó Mal-R, y como control el plásmido pUCP20 que es donde se clonaron los genes de las proteínas reguladoras. La influencia de los reguladores antes mencionados sobre la expresión del gen *lacZ* fue medida por la actividad de β -galactosidasa.

La figura 8 muestra que la actividad de la enzima reportera β -galactosidasa de la fusión cromosomal $\phi(rhIA-lacZ)$, en ausencia de las proteínas reguladoras LasR, RhIR o QscR, aumentó progresivamente durante la curva de crecimiento. La actividad de la enzima fue de cerca 1000 U.M. a 1.5 de D.O_{600nm}.

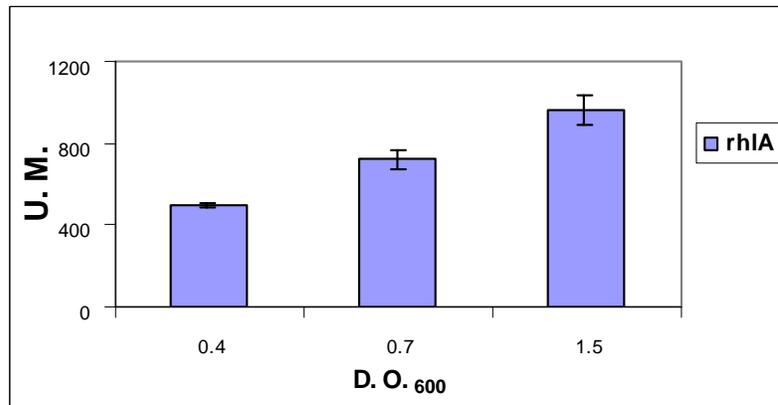


Figura 8. Actividad β -galactosidasa en función de la densidad celular durante el crecimiento de la cepa MC4100 conteniendo la fusión cromosomal $\phi(rhIA-lacZ)$. Se muestra que conforme aumenta la densidad celular aumenta la actividad.

La figura 9 muestra que la actividad de la enzima reportera β -galactosidasa del plásmido pRS551 con la fusión $\phi(rhIA-lacZ)$ en la cepa MC4100 y en la mutante *rpoS*, en ausencia de las proteínas reguladoras LasR, RhIR o QscR, aumentó progresivamente conforme las células llegaban a fase estacionaria, La actividad de la enzima fue de cerca 20000 U.M. en la cepa MC4100 y 12000 U. M. para la mutante *rpoS* a una D.O_{600nm} de 1.5.

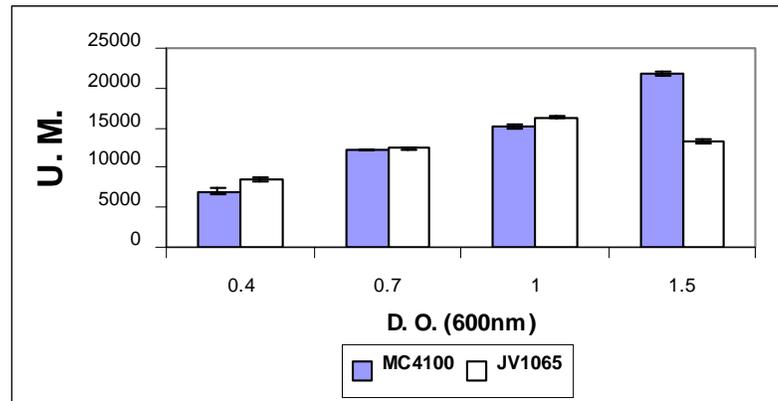


Figura 9. Actividad β -galactosidasa en función de la densidad celular durante el crecimiento de la cepa MC4100 conteniendo el plásmido pRS551 con la fusión $\phi(rhIA-lacZ)$ y en la JV1065.

De lo anterior deducimos que el promotor híbrido que construimos es sólo parcialmente dependiente de RpoS, ya que la actividad de β -galactosidasa es similar en la cepa MC4100 que en la mutante en el gene que codifica para este factor sigma hasta una D.O 600nm de 1.0, mientras que a mayores densidades ópticas, ya no se sigue aumentando la actividad en esta mutante.

Nosotros esperábamos obtener la misma actividad específica de esta enzima ya que el promotor que usamos se supone que debería ser constitutivo. Consideramos que esto no sucedió debido a que el promotor que construimos tiene 19 pares de bases entre las secuencias -10 y -35 y se ha reportado que los promotores con mas de 17 pares de bases son transcritos primordialmente por la RNA polimerasa que tiene la subunidad sigma S (Typas y Hengge, 2006).

Con estos resultados se decidió evaluar la unión de la proteína RhIR a la caja las de *rhIA* en fase estacionaria temprana ya que esto nos permitiría tener mayor sensibilidad para cuantificar la represión mediante la disminución de actividad de β -galctosidasa con respecto a su control.

7.2 Represión del gene *lacZ* por la interacción de RhIR a la caja las de *rhIA*.

Para determinar la interacción de RhIR con la caja las de *rhIA* los cultivos tanto de la fusion $\phi(rhIA-lacZ)$ en presencia de RhIR, así como nuestro control $\phi(rhIA-lacZ)$ en ausencia del regulador (con el vector pUCP20) se crecieron a D.O_{600nm} de 1.5, sin ninguna adición, o en presencia de 10 μ M de los autoinductores C₄-HSL o 3O-C12-HSL, 1mM de IPTG y la combinación de estos.

La figura 10 muestra que la actividad de la enzima reportera β -galactosidasa de la fusión cromosomal $\phi(rhIA-lacZ)$, en presencia del regulador RhIR (barra en cuadros) o en presencia del vector pUCP20 (barras azules) después de haber crecido a 1.5 de D.O_{600nm} en medio LB

suplementado con 10 μ M de los autoinductores C₄-HSL o 3O-C₁₂-HSL, 1mM de IPTG y la combinación de estos o sin ninguna adición, disminuyó más del 40% en todas las condiciones. La actividad de la enzima en ausencia del regulador fue de 800- 850 U. M. mientras que en el caso donde estuvo RhIR presente la máxima actividad registrada fue de 400 U.M. Observamos una represión de más del 40% en todos los casos lo que nos indica que con sólo la transcripción basal del gen *rhIR* es suficiente para reprimir el sistema.

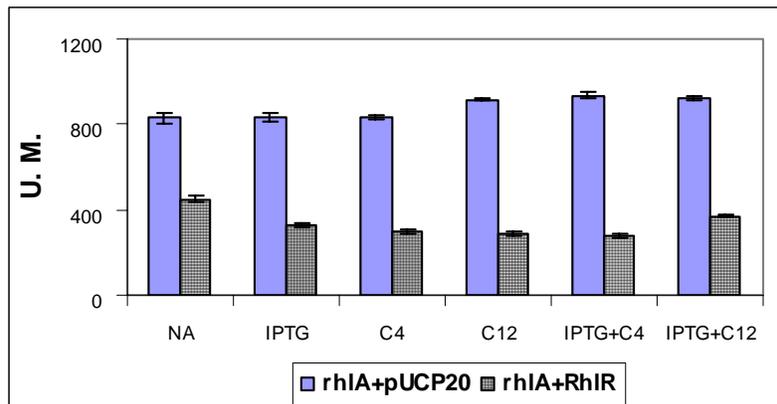


Figura 10. Efecto de RhIR, en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las de *rhIA* (barras en cuadros) con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100.

Para observar con más sensibilidad la diferente unión aparente de RhIR a la caja las de *rhIA* en las diferentes condiciones probadas los datos se graficaron en porcentaje de represión (Fig.11).

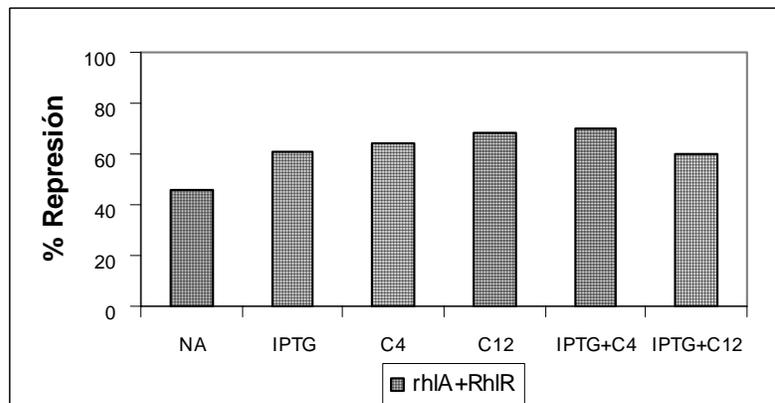


Figura 11. Efecto de represión de *lacZ* por RhIR, en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las de *rhIA* (barras en cuadros).

Como se aprecia en la figura 11, el porcentaje de represión aumenta de un 45% cuando no se le adiciona nada a cerca de un 60% cuando se induce la expresión RhIR, o cuando forma un complejo con los autoinductores. Este resultado sugiere que RhIR interacciona directamente con la caja las de *rhIA* en ausencia o presencia del autoinductor, y que lo hace más fuertemente cuando está acomplejado con los autoinductores C₄-HSL o 3O-C₁₂-HSL. Asimismo, la sobre expresión de la proteína RhIR al adicionarse IPTG al cultivo aumenta dicha interacción en ausencia de los autoinductores, pero no tiene un efecto significativo cuando los autoinductores están presentes.

Los resultados obtenidos *in vivo* con el promotor artificial, coinciden con los encontrados *in vitro* usando geles de retardamiento (Medina *et al.*, 2003c), ya que detectamos que RhIR interacciona a la caja las de *rhIA* en ausencia y presencia de los autoinductores C₄-HSL, y 3O-C₁₂-HSL. Sin embargo, en el sistema *in vivo* reportado aquí, no es aparente que la proteína RhIR interaccione con mayor afinidad a la caja las de *rhIA* en ausencia de C₄-HSL que en su presencia, sino que detectamos el efecto contrario. Este resultado contrario posiblemente se deba a que en los ensayos *in vitro* se trabaja con concentraciones saturantes del DNA blanco y con extractos celulares, mientras que con el promotor artificial vemos la interacción en condiciones fisiológicas. Aunque con la salvedad que aquí se reportan datos en un fondo genético de *E. coli*.

Como se mencionó en la introducción, el autoinductor 3O-C₁₂-HSL interacciona con RhIR y desplaza al C₄-HSL (Pesci *et al.*, 1997); el complejo RhIR/3O-C₁₂-HSL no activa la transcripción del operón *rhIAB* (Pesci *et al.*, 1997). Nuestros resultados sugieren que *in vivo* el complejo RhIR/3O-C₁₂-HSL sí interactúa a la caja las de *rhIA*, por lo que la falta de activación transcripcional de este gene debe ser causada porque la interacción de este complejo con la RNA polimerasa es distinta a la que se da entre RhIR/C₄-HSL que sí activa la transcripción.

7.3 Interacción de la proteína Mal-R con la caja las de *rhIA*.

Otro ensayo que probamos fue la interacción de la proteína de unión a maltosa Mal-R con la caja las de *rhIA*. Para ello se utilizaron las mismas condiciones de crecimiento que en los ensayos anteriores, pero en presencia del plásmido pUCMR que expresa la proteína Mal-R.

La figura 12 muestra que la actividad de la enzima reportera β -galactosidasa de la fusión cromosomal $\phi(rhIA-lacZ)$, en presencia de la proteína de fusión Mal-R (barras negras) disminuyó un 25% respecto al vector pUCP20 (barras azules), esto después de haber crecido a 1.5 de D.O_{600nm} en medio LB suplementado con 10 μ M de los autoinductores C₄-HSL o 3O-C₁₂-HSL, 1mM de IPTG y la combinación de estos o sin haber adicionado ningún reactivo. La actividad de la enzima en ausencia del regulador fue de 800- 850 U. M. mientras que en presencia de la proteína de fusión Mal-R la máxima actividad registrada fue de 600 U.M.

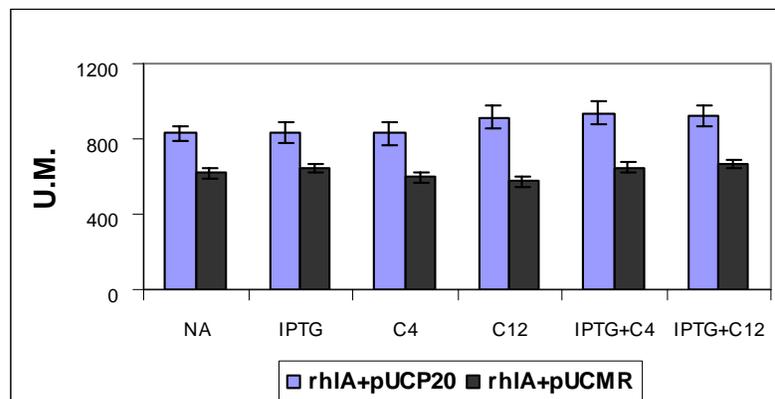


Figura 12. Efecto de Mal-R en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las de *rhIA* (barras negras) con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100.

De la misma manera que con la proteína silvestre se grafico el porcentaje represión (Fig. 13), encontrándose que la magnitud de represión es de

hasta 35%. De igual manera que con la proteína silvestre se observa un aumento en la afinidad aparente de Mal-R cuando se adiciona los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL. Es de resaltarse que a diferencia de RhIR, la proteína de fusión Mal-R no aumenta su interacción aparente con la caja las *rhIA* cuando se sobre expresa por la adición de IPTG al cultivo (Fig. 13).

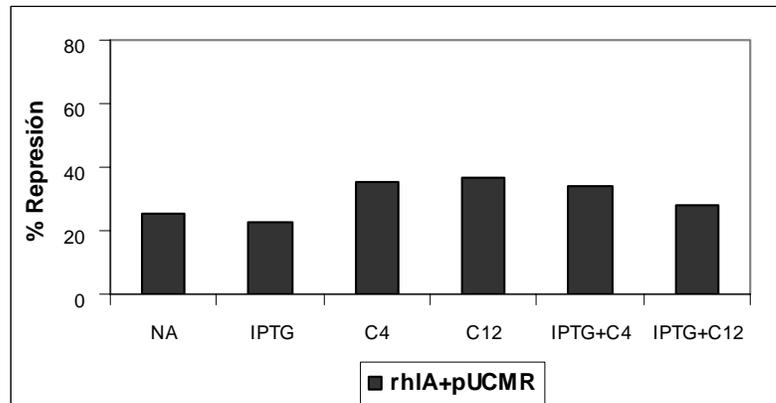


Figura 13. Efecto de represión de *lacZ* por Mal-R, en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las de *rhIA* (barras negras).

En base a estos datos deducimos que la proteína de fusión Mal-R interacciona con la caja *rhIA* en todas las condiciones probadas, pero esta interacción es mayor cuando se encuentran en el medio los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL. Para comparar el porcentaje de represión que ejerce la proteína silvestre RhIR comparada con la proteína de fusión Mal-R se compararon los resultados anteriores con los de la proteína silvestre graficándolos en una sola gráfica.

La figura 14 muestra que el porcentaje de represión de la actividad de la enzima β -galactosidasa de la fusión cromosomal $\phi(rhIA-lacZ)$, en presencia de la proteína RhIR (barras en cuadros) y en presencia de la proteína de fusión M-RhIR (barras negras) es mayor con la proteína silvestre. De esta observación deducimos que, aunque ambas proteínas tienen un comportamiento semejante, ya que ambas interaccionan directamente con la caja las de *rhIA* en todas las condiciones probadas, y en ambos casos disminuye más la actividad enzimática cuando están

interactuando con los reguladores, presentan una afinidad aparente diferente. El porcentaje de represión máxima es mayor (cerca de 70%) para el caso de RhIR, contra un 35% de la proteína de fusión Mal-R. Asimismo, podemos ver que la sobre expresión de la proteína de fusión Mal-R, en ausencia de los autoinductores, no aumenta la interacción con la caja las de *rhIA*.

Estos resultados sugieren que la proteína de unión a maltosa fusionada a RhIR afecta la interacción de RhIR con la caja *rhIA*, y que al sobre expresar esta proteína de fusión no aumenta significativamente la cantidad de proteína que interacciona con el DNA, probablemente debido a que no se estructure bien en ausencia de los autoinductores. Cabe mencionar que la expresión de la proteína de fusión Mal-R afecta el crecimiento celular retrasando la fase estacionaria (datos no mostrados).

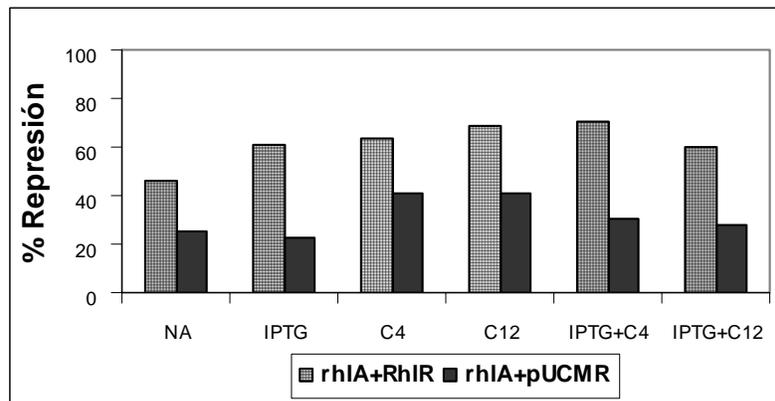


Figura 14. Efecto de represión de *lacZ* por RhIR (barras en cuadros) y de Mal-R (barras negras), en presencia de los autoinductores C₄-HSL y C₁₂-HSL sobre la caja las de *rhIA* (barras negras).

7.4 Interacción de las proteínas LasR y QscR con la caja las de *rhIA*.

LasR y QscR son otros dos reguladores de la respuesta sensora de quórum. A diferencia de LasR y RhIR, no se ha probado si QscR regula el gene *rhIA*. LasR y RhIR regulan el gene *rhIA* con distinta especificidad (Pearson, 1997; Medina, 2003c). Por ejemplo *rhIA* es activado por LasR/3O-C₁₂-HSL solo en un 10% de lo que lo hace por RhIR/C₄-HSL

(Pearson, 1997; Medina *et al.*, 2003c). Por ello se decidió estudiar la interacción de los reguladores LasR y QscR con la caja las de *rhIA* cuantificando la represión mediante la disminución de actividad de β -galactosidasa de la fusión $\phi(rhIA-lacZ)$ con respecto a su control. Para llevar a cabo esto, los cultivos tanto de la fusión *rhIA::lacZ* en presencia de LasR (barras blancas), QsCR (barras moteadas) así como nuestro control en presencia de pUCP20 (barras azules) se crecieron en presencia de 10 μ M del autoinductor 3O-C₁₂-HSL, a una D O_(600nm) de 1.5 (Fig. 15).

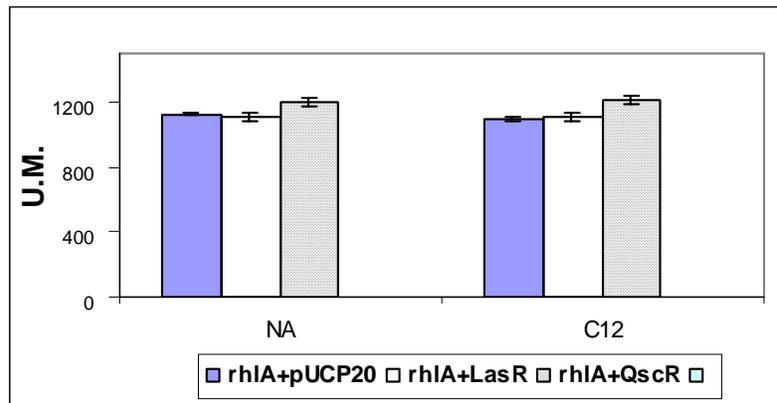


Figura 15. Efecto de LasR (barras blancas) y QscR (barras moteadas) en presencia del autoinductor 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las de *rhIA* con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100.

En la figura 15 se observa que la actividad enzimática de la enzima β -galactosidasa de la fusión cromosomal $\phi(rhIA-lacZ)$, en presencia de las proteínas LasR (barras blancas) o QscR (barras moteadas) o del vector pUCP20 (barras azules) no disminuye en presencia del autoinductor 3O-C₁₂-HSL, manteniendo siempre una actividad de alrededor de 1000 U. M.

Estos resultados sugieren que LasR y QscR no interactúan con la caja las de *rhIA*. Estos datos no concuerdan con los estudios reportados anteriormente (Pearson, 1997; Medina *et al.*, 2003c) ya que LasR/3O-C₁₂-HSL es capaz de activar la transcripción de una fusión $\phi(rhIA-lacZ)$, aunque con una baja actividad. Esto se puede deber a que el ensayo de unión mostrado aquí tiene una menor sensibilidad que el ensayo de activación transcripcional, o a que en los resultados mostrados en la

figura 15 se midió la unión de la proteínas regulatorias expresadas por la transcripción basal del gen *rhIR* a partir del promotor *lac*. Para determinar si nuestro ensayo detecta la unión de LasR/3O-C₁₂-HSL que determina la activación del promotor de *rhIA* habría que realizar el mismo ensayo sobre produciendo la proteína en presencia de IPTG.

7.5 Interacción de LasR y RhIR a la caja las de *rhIR*.

En *Pseudomonas aeruginosa* el gene *rhIR* codifica para el regulador transcripcional RhIR; el cual, como se ha descrito, juega un papel central en la respuesta sensora de quórum. Como se puede observar en la Tabla 2, el gene *rhIR* tienen dos cajas las funcionales, ambas reguladas únicamente por LasR, pero de manera diferente. Cuando LasR/3O-C₁₂-HSL se une a la primera caja (las box-1) activa su expresión. Mientras que para la segunda caja (las box-2) este mismo regulador tiene un efecto negativo (Medina *et al.*, 2003a).

A diferencia de la cajas *rhIA* y *phzA1* que constan de 20 nucleótidos, la caja las *rhIR1* tiene 19 pares de bases (5'-TTGACAATCTGCGCGCTTGACAGCGATAAT-3'). Debido al interés en la regulación del gen *rhIR* (Medina *et al.*, 2003a) en el laboratorio de la Dra. Gloria Soberón, se decidió estudiar la interacción de los reguladores LasR y RhIR a esta caja las mediante la construcción de un promotor artificial. Este promotor se construyó de la misma manera que para la caja las de *rhIA*. Para llevar a cabo esto, los cultivos con la fusión ϕ (*rhIR-lacZ*) en presencia de RhIR (barra en cuadros, Fig. 16) LasR (barras blancas, Fig. 16) así como nuestro control (barras azules, Fig. 16) en ausencia del regulador (con el vector pUCP20), se crecieron a una densidad óptica_(600nm) de 1.5, sin ninguna adición, o en presencia de 10 μ M de los autoinductores C₄-HSL o 3O-C₁₂-HSL, 1mM de IPTG y la combinación de estos.

La figura 16 muestra que RhIR (barras en cuadros) no reprime nuestro sistema en ninguna de las condiciones estudiadas, mientras que el regulador LasR reprime la expresión de la actividad de β -galactosidasa sólo cuando está acompañado con el autoinductor 3O-C12-HSL (barras blanca).

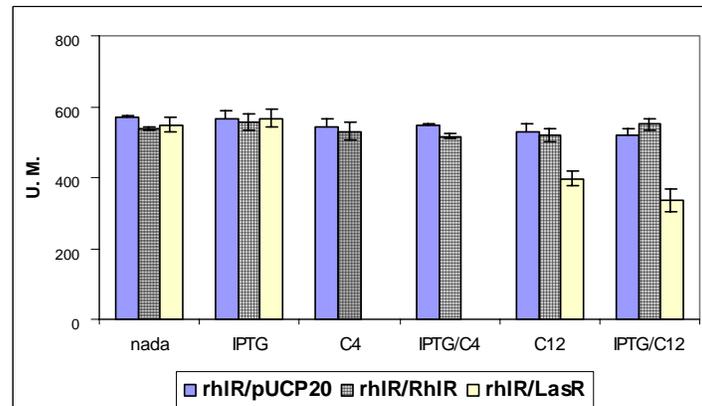


Figura 16. Efecto de RhIR (barras en cuadros) y LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las de *rhIR* con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100.

La figura 17 muestra que el porcentaje de represión aumenta de un 25.2% cuando se adiciona 10 μ M de 3O-C₁₂-HSL a las células que expresan LasR por el escape del promotor *lac* a un 35.6% cuando además del autoinductor se sobre expresa la proteína LasR por la adición de 1mM de IPTG. Este resultado muestra que LasR solamente reconoce y se une a la caja las de *rhIR* en presencia del autoinductor, y coincide con los datos genéticos reportados por Kiratisin y colaboradores en 2002. Asimismo, corrobora los datos reportados por Latifi *et al.* (1996) y Medina *et al.* (2003b) que mostraron que la expresión de *rhIR* depende de LasR/3O-C₁₂-HSL. Además, este resultado complementa el trabajo recientemente publicado por Schuster *et al.*, (2004b) donde purificaron la proteína LasR y evaluaron su unión a diferentes promotores ya que estos autores encontraron que esta proteína efectivamente se une a ciertas cajas las sólo en presencia del autoinductor, pero no probaron la caja las *rhIR1*.



Figura 17. Efecto de represión de *lacZ* por RhIR (barras en cuadros), LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL, sobre la caja las de *rhIR*.

7.6 Interacción de las proteínas LasR y RhIR a cajas las mutantes derivadas de la caja de *rhIR*.

Adicionalmente se obtuvieron dos fusiones más para la caja las de *rhIR*, pero a diferencia de la caja silvestre estas presentan algunos cambios en la secuencia que, como se verá enseguida, se reflejan en la interacción del regulador LasR/3O-C12-HSL. A continuación se muestra su análisis.

La primera fusión se le nombro *rhIRa* y presenta la siguiente secuencia **ATCTCGGCGGCGTTACAGCG**. Consta de 20 pares de bases y las letras en cursivas y en negritas son los cambios obtenidos. Si comparamos esta secuencia con la secuencia de la caja silvestre tenemos que:

ATCTCGGCGGCGTTACAGCG
ATCTGCGCGCTTG-ACAGCG

Los sitios invariables CT y AG que se encuentran subrayados se conservan y la distancia entre estos es mayor en la caja *rhIRa* con respecto a la *rhIR1* original, llegando a la distancia consenso de 12 nucleótidos entre las secuencias invariables.

De igual manera que en el caso anterior se estudio la interacción de los reguladores RhIR y LasR sobre esta secuencia. Los ensayos fueron sometidos a las mismas condiciones que con la caja las de *rhIR1* silvestre, encontrándose un comportamiento similar con respecto a la silvestre, con las diferencias que se presentan a continuación.

La figura 18 muestra que la actividad de la enzima reportera β -galactosidasa de la fusión cromosomal $\phi(rhIRa-lacZ)$, en presencia del regulador LasR (barras blancas), RhIR (barras en cuadros) o en presencia del vector pUCP20 (barras azules) después de haber crecido a 1.5 de D.O_{600nm} en medio LB suplementado con 10 μ M de los autoinductores C₄-HSL o 3O-C12-HSL, 1mM de IPTG y la combinación de estos o sin ninguna adición, no disminuyó en presencia del regulador RhIR. Esto cambio en presencia del regulador LasR, reflejándose en la disminución de la actividad solo en presencia del autoinductor 3O-C12-HSL o bien cuando además del autoinductor se adicionó IPTG. La actividad de la enzima en presencia de RhIR o el vector pUCP20 fue de 1400 U. M. mientras que en el caso donde estuvo RhIR presente la máxima actividad registrada fue de 750 U.M.

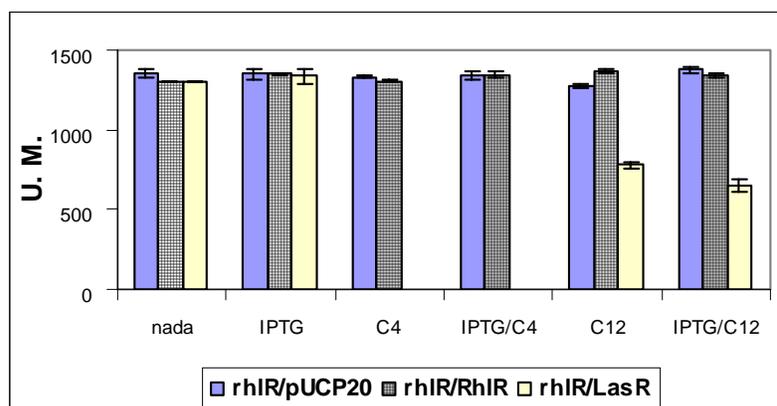


Figura 18. Efecto de RhIR (barras en cuadros) y LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las de *rhIRa* con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100

Para apreciar mejor la magnitud de represión que ejerce la proteína LasR acomplejada con el autoinductor 3O-C₁₂-HSL sobre el sistema se graficaron los datos en porcentaje.

La Figura 19 muestra que bajo ninguna condición estudiada con la proteína RhIR (barras en cuadros) hubo represión de la actividad de la enzima β -galactosidasa de la fusión cromosomal $\phi(rhIRa-lacZ)$. Mientras que en presencia del regulador LasR (barras blancas), el porcentaje de represión fue de entre un 39.3% a un 53.1% cuando se adiciona 10 μ M de 3O-C₁₂-HSL a las células que expresan LasR o bien cuando además del autoinductor se sobre expresa la proteína LasR por la adición de 1mM de IPTG, respectivamente.

Cuando se compara este resultado con el de la caja *rhIR1* silvestre observamos que a pesar de que es el mismo comportamiento pues ambos se unen a la caja sólo cuando se encuentran en la forma LasR/3O-C₁₂-HSL, la magnitud de represión no es la misma. En la fusión $\phi(rhIRa::lacZ)$ hay mayor represión (20% más) por LasR/3O-C₁₂-HSL, lo que muestra que esta proteína tiene una mayor afinidad aparente por la caja *rhIRa* que por la caja original *rhI1*. Esto puede ser debido a que la caja mutante presenta 12 nucleótidos entre los sitios consensos y que es la distancia ideal para la unión de LasR y RhIR establecida por Whiteley y colaboradores en 1999.

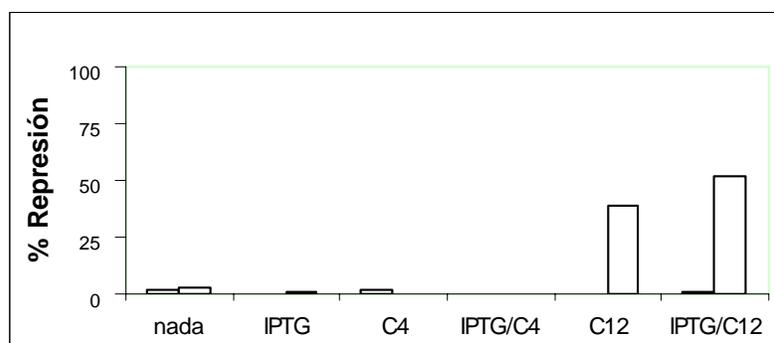
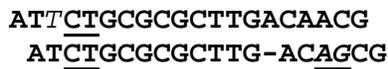


Figura 19. Efecto de represión de *lacZ* por RhIR (barras en cuadros), LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las *rhIRa*.

La otra fusión que se obtuvo se le nombro *rhIRb* y presenta la siguiente secuencia ATTCTGCGCGCTTGACAACG; y a diferencia de *rhIR1* ésta consta de 20 pares de bases con una inserción de una timina en el sitio consenso (CT), perdiendose el sitio consenso AG



De igual manera que en el caso anterior se estudió la interacción de los reguladores RhIR y LasR sobre esta secuencia. La figura 20 muestra que la actividad de la enzima reportera β-galactosidasa de la fusión cromosomal φ(*rhIRb-lacZ*), en presencia del regulador LasR (barras blancas), RhIR (barras en cuadros) o en presencia del vector pUCP20 (barras azules) después de haber crecido a 1.5 de D.O_{600nm} en medio LB suplementado con 10μM de los autoinductores C₄-HSL o 3O-C₁₂-HSL, 1mM de IPTG y la combinación de estos o sin ninguna adición, no disminuyó en presencia de ningún regulador y en ninguna condición. La actividad de la enzima en presencia de los reguladores así como del vector pUCP20 fue cercana a las 200 U. M.

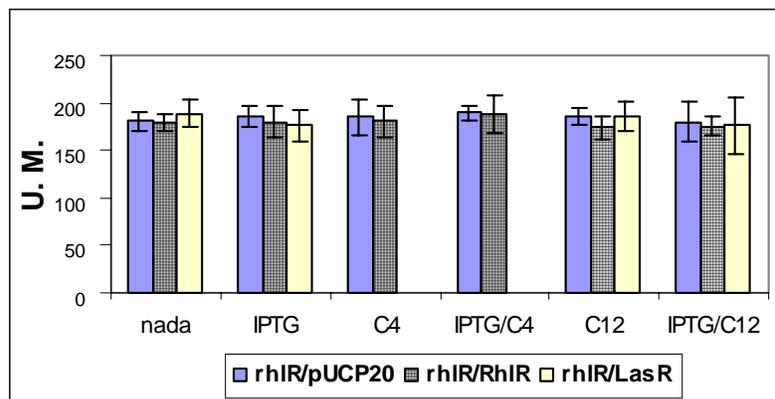


Figura 20. Efecto de RhIR (barras en cuadros) y LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄ y C₁₂ sobre la caja las de rhIRb con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100

Estos resultados sugieren que las bases invariables de las cajas las son indispensables para la interacción de los reguladores LasR y RhIR, por lo que la falta de alguna de ellas es crucial para la unión del regulador al DNA.

7.7 Interacción de LasR y RhIR a la caja las de *phzA1*.

P. aeruginosa produce la fenacina conocida como piocianina que tiene un papel importante como un factor de virulencia (Ran *et al.*, 2003). Esta bacteria tiene dos operones funcionales para la síntesis de piocianina que tienen los genes *phzABCDEFG* (Mavrod *et al.*, 2001). El operón *phz1* se regula por la respuesta sensora de quórum y se encuentra una caja las en su región regulatoria (Whiteley *et al.*,1999), mientras que se desconocen las condiciones de expresión del operón *phz2*. Las evidencias genéticas con las que se cuentan sugieren que el operón *phz1* es activado transcripcionalmente por RhIR/C₄-HSL. Esto es, una fusión transcripcional *phzA1* no se expresa en una mutante *lasR* ni en una *rhIR* y una doble mutante *lasI*, *rhII* sólo la expresa en presencia de los dos autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HS (Whiteley *et al.*,1999 y 2001). Con base en estas evidencias quisimos determinar la unión de los reguladores transcripcionales LasR y RhIR con la caja las *phzA1*, suponiendo que sería RhIR el que se uniera específicamente a esta caja. Para ello construimos un promotor artificial con la fusión $\phi(phzA1-lacZ)$.

Esta fusión se estudio de la misma manera que las anteriores, creciendo los cultivos tanto de la fusión $\phi(phzA1-lacZ)$ en presencia de

RhIR, LasR así como nuestro control en ausencia del regulador (con el vector pUCP20).

La figura 21 muestra que la actividad de la enzima reportera β -galactosidasa de la fusión cromosomal $\phi(phzA1-lacZ)$, en presencia del regulador LasR (barras blancas), RhIR (barras en cuadros) o en presencia del vector pUCP20 (barras azules) después de haber crecido a 1.5 de D.O_{600nm} en medio LB suplementado con 10 μ M de los autoinductores C₄-HSL o 3O-C₁₂-HSL, 1mM de IPTG y la combinación de estos o sin ninguna adición, no disminuyó en presencia del regulador RhIR, como suponíamos. Sin embargo, esto cambió en presencia del regulador LasR, reflejandose en la disminución de la actividad en presencia del autoinductor 3O-C₁₂-HSL solo o bien cuando además del autoinductor se adicionó IPTG. La actividad de la enzima en presencia de RhIR o el vector pUCP20 fue de 800 U. M. mientras que en el caso donde estuvo LasR presente la máxima actividad registrada fue de entre 200 y 250 U.M.

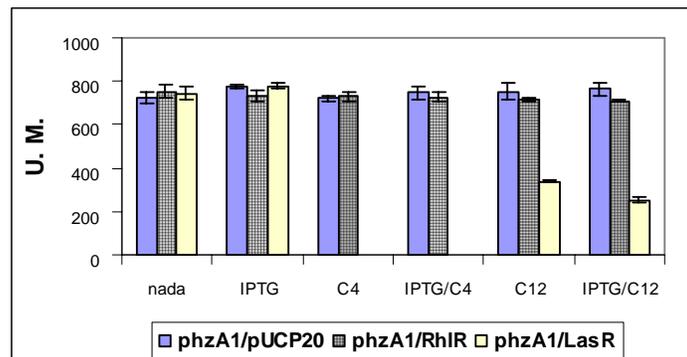


Figura 21. Efecto de RhIR (barras en cuadros) y LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL sobre la caja las de *phzA1* con respecto a su control (barras azules), usando como fondo genético a la cepa MC4100.

Para ver el efecto de represión los datos se graficaron en porcentaje. La Figura 22 muestra que el porcentaje de represión de la actividad de la enzima β -galactosidasa de la fusión cromosomal $\phi(phzA1-lacZ)$, en presencia del regulador RhIR (barras en cuadros) no aumentó bajo ninguna condición estudiada. Mientras que se observa un porcentaje de represión en presencia del regulador LasR (barras blancas) de entre un 55.2% a un 66.8% cuando se adiciona 10 μ M de 3O-C₁₂-HSL a las células

que expresan LasR o bien cuando además del autoinductor se sobre expresa la proteína LasR por la adición de 1mM de IPTG.

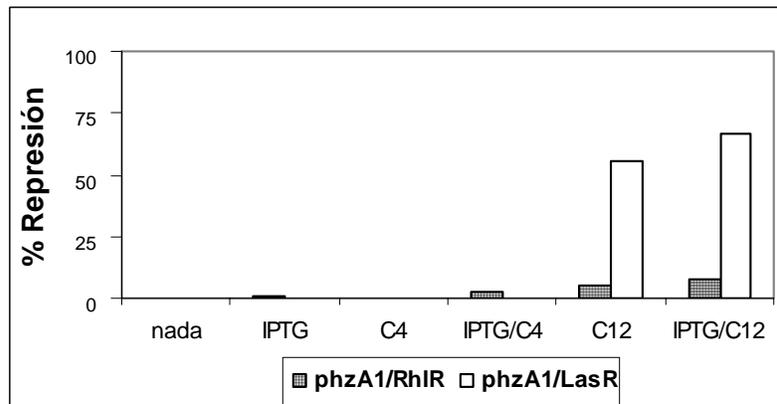


Figura 22. Efecto de represión de lacZ por RhIR (barras en cuadros), LasR (barras blancas) en presencia de los autoinductores C₄ y C₁₂ sobre la caja las de phzA1.

A partir de estos datos podemos inferir que RhIR no interactúa con la caja *phzA1* bajo ninguna condición (barras en cuadros, Fig. 21). Sin embargo, LasR/3O-C₁₂-HSL reprime claramente la expresión de dicha actividad, sugiriendo que dicho complejo se une *in vivo* a la caja las de *phzA1*.

Estos datos muestran que en condiciones *in vivo* LasR/3O-C₁₂-HSL interacciona más fuerte con la caja las de *phzA1* que RhIR en presencia o ausencia de C₄-HSL. Estos resultados no son compatibles con los datos genéticos comentados anteriormente y no entendemos en qué reside la discrepancia. Para validar el modelo de *Escherichia coli* estudiaremos una fusión transcripcional *lacZ* con la región reguladora natural del gene *phzA1* para determinar cuál es el comportamiento de la activación transcripcional de este gene en esta bacteria.

Existen datos que muestran que hay algunos elementos regulatorios de esta vía en *P. aeruginosa* que no entendemos del todo. Por ejemplo el gene *lasB*, que codifica para la elastasa B, es regulado preferentemente por LasR/3O-C₁₂-HSL tanto en el fondo genético de *P. aeruginosa* (Whiteley et al., 1999, Schuster et al, 2003a) como en el de *E. coli* (Pearson et al.,1997) y se ha demostrado que la proteína LasR pura en

presencia de 3O-C₁₂-HSL se une a las dos cajas las que presenta este gene (Schuster *et al.*, 2004a). Sin embargo una mutante *rhIR* no expresa al gene *lasB* (Brint y Ohman, 1995). Esto sugiere que RhIR tiene un papel en la expresión del gene *lasB* en el fondo genético de *P. aeruginosa* y muestra que el comportamiento de los reguladores se ve modificado por el fondo genético.

A reserva de determinar si en *P. aeruginosa* la proteína LasR acompañada con el autoinductor 3O-C₁₂-HSL se une preferentemente a la caja las de *phzA1*, el sistema de promotores artificial desarrollado en este trabajo nos permite tener dos secuencias muy similares, cajas las de *rhIA* y *phzA1* (sólo difieren en 5 de sus 20 bases), a las que se unen las proteínas RhIR y LasR con muy distinta afinidad para estudiar la unión diferencial de RhIR y LasR/3^o-C₁₂-HSL. Este modelo nos permitirá definir mediante mutagénesis dirigida, cuál es el papel de cada de una de estas bases en la afinidad para la unión de los reguladores transcripcionales RhIR y LasR.

8. CONCLUSIONES

- La construcción de promotores artificiales con cajas las entre la secuencia -10 y -35, nos permiten detectar la interacción específica de los reguladores LasR y RhlR de *P. aeruginosa* a sus secuencias blanco de DNA.
- La proteína RhlR, así como la proteína de fusión de este regulador con la proteína de unión a matosa (MalE), interaccionan con la caja las de *rhIA*. Esta interacción se lleva a cabo con o sin los autoinductores C₄-HSL y 3O-C₁₂-HSL
- La proteína LasR, en presencia del autoinductor 3-O-C₁₂-HSL, interacciona con la caja las de *rhIR* y con la de *phzA1*.
- Uno de los dinucleótidos invariables en la caja las de *rhIR1* es crucial para que exista alguna interacción entre el regulador LasR/3-O-C₁₂-HSL con esta secuencia de DNA.
- La distancia entre las secuencias invariantes de las cajas las es relevante en la interacción del regulador LasR. Esta proteína interacciona tanto con cajas con 11 como con 12 pares de bases entre estas secuencias, pero lo hace mejor con aquellas que tienen 12 pares de bases intermedias.

9. PERSPECTIVAS

Para corroborar que LasR/3O-C₁₂-HSL activa la transcripción de *phzA1*, habría que estudiar la expresión de una fusión transcripcional natural *phzA1::lacZ* en el fondo genético de *E. coli*.

Construir promotores artificiales con las cajas las de los genes *lasB* (a la que se une preferentemente LasR) y *lecA* (a la que se supone que se une

preferentemente RhIR) con el sistema que hemos desarrollado y observar su comportamiento en presencia de RhIR y LasR/3O-C₁₂-HSL.

Estudiar la interacción de LasR y RhIR con variantes de las cajas las de *rhIA*, *phzA1*, *lecA* y *lasB* con este mismo modelo, con el objeto de determinar qué bases determinan la especificidad de unión de estos reguladores al DNA.

10. Referencias

- Anderson, R. M., Zimprich C. A. and Rust L. (1999) A second operator is involved in *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) activation. *J. Bacteriol.* 181: 6264-6270.
- Bachmann, B. J. (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev.* 36:525-557
- Bodey G. P., Bolivar R., Fainstein V. y Jadeja, L. (1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* 5:279-313.
- Brint, J. M. y Ohman, D. E. (1995) Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.* 177:7155-7163.
- Campos-García, J., Caro, A. D., Nájera, R., Miller-Maier, R. M., Al-Tahhan, R. A. y Soberón-Chávez, G. (1998) The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlG* gene encodes a NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J. Bacteriol.* 180: 4442-1451.
- Casadaban, M. 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol.* 104:541-555.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D. y James, G. (1994) Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176:2137-2142.
- Chugani, S. A., Whiteley, M., Lee, K. M., D'Argenio, D., Manoil, C. y Greenberg, E. P. (2001) QscR, a modulator of quorum sensing

signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98:2752-2757.

Devine J. H., Shadel, G. S. and Baldwin T. O. (1989) Identification of the operator of the lux regulon of the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:5688-5692.

De Kievit, T. R. y Iglewski, B. H. (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun*. 68:4839-4849.

De Kievit, T. R., Kakai, Y., Register, K., Pesci, E. C. e Iglewski, B.H. (2002) Role of the *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* systems in *rhlI* regulation. *FEMS Microbiol. Lett*. 212:101-106.

De Kievit, T. R., Seed, P. C., Nezezon, J., Passador, L. e Iglewski, B. H. (1999) RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. 181:2175-2184.

Déziel, E. F., Lépine, S., Milot, J., He, M. N., Mindrinos, R. G., Tompkins y Rahme, L. G. (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 101:1339-1344.

Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K., Cámara, M. y Williams, P. (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* signal overcomes the cell density-dependency of quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol. Microbiol*. 50:29-43.

Diggle, S., Winzer, P. K., Lazdunski, A., Williams, P. y Cámara, M. (2002) Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of *N*-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J. Bacteriol*. 184:2576-2586.

- Doring, G., Maier, M., Muller, E., Zoubair, B., Tummler, B. y Kharazmi, A. (1987). Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotic Chemother.* 39:36-148.
- Egland, K. A. y Greenberg, E. P. (2000). Conversion of the *Vibrio fischeri* transcriptional activator LuxR to a repressor. *J. Bacteriol.* 182:805-811.
- Elliott, T. (1992) A method for construction single-copy *lac* fusions in *Salmonella typhimurium* and its application to the *hemA-prfA* operon. *J. Bacteriol.* 174:245-253.
- Fuqua, W. C., Parsek, M. y Greenberg, E. P. (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum-sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35:439-468.
- Gray, K. M., Passador, L., Iglewski, B. H. y Greenberg, E. P. (1994) Interchangeability of components from the quorum-sensing regulatory systems of *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176: 3076-3080
- Greenberg, E. P. (1997) Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *ASM News.* 63: 371-377.
- Kleerebezen, M., Quadri, L. E. N., Kuipers O. P. y de Vos W. M. (1997) Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transductions system in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 24:895-904.
- Kiratisin, P., Tucker, K. D. y Passador, L. (2002) LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes functions as a multimer. *J. Bacteriol.* 184:4912-4919.

- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. and Lazdunski, A. (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR y RhIR (VsmR) to expression of the stationary sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.* 21:1137-1146.
- Lamb, J. R., Patel, H., Montminy, T., Wagner, V. E. e Iglewski, B. H. (2003). Functional domains of the RhIR transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 185:7129-7139.
- Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J. N. y Lazdunski, A. (2003) Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhIR. *Mol. Microbiol.* 48:199-210.
- Lee, J.-H., Lequette, Y. y Greenberg E. P. (2006). Activity of the purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Mol. Microbiol.* 59:602-609.
- Lequette, Y., Lee, H.-E., Ledgham, F., Lazdunski, A. y Greenberg, E. P. (2006) A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing circuit. *J. Bacteriol.* 188:3365-3370.
- Maier R. M. y Soberon-Chávez, G. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:625-633.
- McKnight, S. L., Iglewski, B. H. y Pesci, E. C. (2000) The *Pseudomonas* quinolone signal regulates *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182:2702-2708.
- Martinez, A. y Soberón-Chávez, G. (2001) Characterization of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* IGB83. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:731-735.

- Medina, G., Juárez, K., Díaz, R. y Soberón-Chávez, G. (2003a) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa rhIR* encoding a quorum sensing regulatory protein. *Microbiol.* 149:3073-3081.
- Medina G., Juárez, K. y Soberón-Chávez, G. (2003b) The *Pseudomonas aeruginosa rhIAB* operon is not expressed on the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer *N*-butanoyl-homoserine lactone. *J. Bacteriol.* 185:377-380.
- Medina, G., Juárez, K., Valderrama, B. y Soberón-Chávez, G. (2003c) Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhIR transcriptional regulation of the *rhIAB* promoter. *J. Bacteriol.* 185:5976-5983.
- Miller, R. M. (1995) Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl):59-62.
- Miller, J. H. (1992) A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. Pp. 43-80.
- Miller, M. B. y Bassler, B. L. (2001) Quorum Sensing in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55:165-199.
- Nealson, K. H. (1977) Autoinduction of bacterial luciferase: occurrence, mechanism and significance. *Arch. Microbiol.* 112:73-79.
- Nicas, T. L., e Iglewski, B. H. (1985) The contributions of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 31:387-392.

- Ochsner, U. A., Fiechter, A. y Reiser, J. (1994) Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.* 269:9787-19795.
- Pearson, J. P., Pesci, E. C. e Iglewski, B. H. (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 179:5756-5767.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, Patrick C. e Iglewski, B. H. (1997) Regulation of *las* and *rhl* Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179:3127-3132.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. e Iglewski, B. H. (1999) Quinolone signaling in the cell to cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:11229-11234.
- Pessi, G. y Haas, D. (2000) Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum sensing regulators LasR and RhIR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182:6940.
- Poole, K. (2001) Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3:255-264.
- Rahim, R., Ochsner, U., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S. y Soberón-Chávez, G. (2001) Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnosyl transferase-2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 40: 708-718.

- Ran, H., Hassett, D. J. y Lau, G. W. (2003) Human targets of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:14315-14320.
- Rust, L., Pesci, E. C. e Iglewski, B. H. (1996) Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) regulatory region. *J. Bacteriol.* 178:1134-1140
- Shadel, G. S. y Baldwin, T. O. (1991) The *Vibrio fischeri* Lux protein is capable of bidirectional stimulation of transcription and both positive and negative regulation of the *luxR* gene. *J. Bacteriol.* 173:568-574.
- Schaeffer, A. L., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan Jr, J. E. y Greenberg, E. P. (1996) Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserin lactone synthase activity purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:9505-959.
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T. y Greenberg, E. P. (2003) Identification, timing and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 185:2066-2079.
- Schuster, M., Urbanowski, M. L. y Greenberg, E. P. (2004b) Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc, Natl. Acad. Sci. USA.* 101:15833-15839.
- Seed, P. C., Passador, L. e Iglewski, B. H. (1995) Activation of the *Pseudomonas aeruginosa lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J. Bacteriol.* 177: 654-659.

- Simons, R. W., Houman, F. y Kleckner, N. (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* 53:85-96.
- Smith, R. S. e Iglewski, B. H. (2003) *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence *Curr. Opin. Microbiol.* 6:56-60.
- Soberón-Chávez, G., Aguirre-Ramirez, M. y Ordóñez, L. (2005) Is *Pseudomonas aeruginosa* only “Sensing Quórum”. *Crit. Rev. Microbiol.* 31:171-182.
- Stevens, A. M., Dolan, K. M. y Greenberg, E. P. (1994) Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:1619-12623.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., *et al.* (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959-964.
- Typas A. y Hengge R. (2006) Role of the spacer between the -35 and -10 regions in σ promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 59:1037-1051.
- Toder, D. S., Ferrel, S., Nezezon, J., Rust, L. e Iglewski, B. H. (1994) *lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity. *Infect. Immun.* 62:1320-1327.
- Urbanowski, M. L., Lostroh, C. P. y Greenberg, E. P. (2004) Reversible acyl-homoserine lactone binding to purified *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J. Bacteriol.* 186:631-637

- van Delden, C. e Iglewski, B. H. (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 4:551-560.
- Ventre, I., Ledgham, F., Prima, V., Lazdunski, A., Foglino, M. y Sturgis, J. N. (2003) Dimerization of the quorum sensing regulator RhIR: development of a method using EGFP fluorescence anisotropy. *Mol. Microbiol.* 48:187-198.
- Visick, K. L. y McFall-Ngai, M. J. (2000) An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* partnership. *J. Bacteriol.* 182:1779-17897.
- Visick, J. E. y Clarke, S. (1995) Repair, refold, recycle: how bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins. *Mol. Microbiol.* 16:835-845.
- Von Bodman, Susanne B., K. Ball, Jessica., Faini, Marie A., Herrera, Carmen M., Minogue, Timothy D., Urbanowki, Mark L. y Stevens, Ann M. (2003) The Quorum Sensing Negative Regulators EsaR and ExpREcc, Homologues within the LuxR Family, Retain the Ability To Function as Activators of Transcription. *J. Bacteriol.* 185:7001-7007.
- Wagner, E. V., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A. I. y Iglewski, B. H. (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185:2080-2095.
- West, S. E. H., Schweizer, H. P., Dall, C., Sample, A. K. y Runyen-Janecky, L. J. (1994) Construction of improved *Escherichia coli*-*Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUCP18/19 and secence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene.* 128:81-86.

Whitehead N. A., Bernard, A. M. L., Slater H., Simpson N.J. L. y Salmond G. P. (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:365-404.

Whiteley, M., Lee, K. M. y Greenberg, E. P. (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:13904-13909.

Whiteley, M., Banger, M. G., Bamgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. y Greenberg, E. P. (2001) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413: 860-864.

Whiteley, M. y Greenberg, E. P. (2001) Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J. Bacteriol.* 183:5529-5534.