



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Relación de la actividad transcripcional de los dos
operones *phzABCDEFG* y del gen *phzM* con la
sobreproducción de pirocianina en *Pseudomonas*
aeruginosa ID4365

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

CHRISTIAN MANOELL SANTOS MEDELLÍN



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Luis Servín González
2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno
Santos
Medellín
Christian Manoell
62859359
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304535749
2. Datos del tutor
Dr.
Luis
Servín
González
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Claudia Andrea
Segal
Kischinevsky
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Rosa Laura
Camarena
Mejía
5. Datos del sinodal 3
M. en C.
Alejandra Abigail
González
Valdez
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Gabriela
González
Cerón

7. Datos de la tesis

Relación de la actividad transcripcional de los dos operones *phzABCDEFG* y del gen *phzM* con la sobreproducción de picianina en *Pseudomonas aeruginosa* ID4365

70 p

2012

Agradecimientos

Al Dr. Luis Servín González por haberme proporcionado todos los elementos necesarios para llevar a cabo este proyecto

A la Dra. Gloria Soberón Chávez por su invaluable asesoría durante el desarrollo de este trabajo.

A la M. en C. Gabriela González Cerón por su constante apoyo técnico, así como por las correcciones hechas a este escrito.

A la M. en C. Alejandra Abigail González Valdez por las sugerencias hechas en los distintos seminarios y por la revisión de esta tesis.

A la M. en C. Victoria Grosso Becerra por la ayuda brindada durante la extracción y cuantificación del autoinductor C₄-HSL.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada y al P. de Q.F.B. Rafael Álvarez Chimal por el apoyo proporcionado durante la purificación y caracterización del ácido fenazin-1-carboxílico (PCA).

Al Dr. Luis David Alcaraz por el armado preliminar del genoma de *Pseudomonas aeruginosa* ID4365

A la Dra. Laura Camarena Mejía y a la Dra. Claudia Segal Kischinevzky por las observaciones hechas a este escrito

A Auri, Daniela, Isaí, Jaqueline, Laura, Manuel, Martí y Tania por haber hecho más amena mi estancia en el laboratorio.

A la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM

Al PAPIIT por haber financiado el proyecto IN202510: "Estudio genómico de aislamientos ambientales de *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias filogenéticamente relacionadas".

A mis padres y a Natalia

Índice

Resumen	1
Introducción	2
1. Biología de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
2. Píocianina	4
2.1. Biosíntesis	5
2.2. Regulación por temperatura de la producción de píocianina	8
3. “Quorum sensing”	9
3.1. “Quorum sensing” en <i>Aliivibrio fischieri</i>	9
3.2. “Quorum sensing” en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
4. Diversidad genómica dentro de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
Antecedentes	15
Hipótesis	17
Objetivos	17
Materiales y métodos	18
1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos	18
2. Curvas de crecimiento y producción de píocianina	20
3. Construcción de las fusiones transcripcionales	20
4. Ensayos de expresión	22
4.1. Medición de β -galactosidasa	22
5. Medición de los niveles de PCA	23
5.1. Purificación de PCA	23
5.2. Caracterización de PCA	24
5.3. Extracción de PCA	24
5.4. Comparación relativa de los niveles de PCA	24

6. Medición de los niveles C ₄ -HS	25
6.1. Extracción de C ₄ -HS	25
6.2 Comparación de los niveles relativos de C ₄ -HS	25
Resultados y Discusión	26
1. Crecimiento y producción de piocianina	26
2. Estado de los operones <i>phz</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ID4365	28
3. Actividad transcripcional de los operones <i>phzABCDEFG</i>	33
4. Actividad transcripcional de <i>phzM</i>	39
5. Niveles de PCA	41
6. Aumento en sistema rhIR	44
Conclusiones	48
Perspectivas	49
Apéndice 1 (Caracterización de PCA)	50
Apéndice 2 (Medios de cultivo, buffers y reactivos)	52
Apéndice 3 (Protocolos)	54
Bibliografía	61

Resumen

La piocianina es uno de los principales factores de virulencia producidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Los niveles de este compuesto varían entre diferentes cepas, así como entre diferentes temperaturas de crecimiento. Recientemente, se ha demostrado que la cepa ID4365 presenta una sobreproducción de piocianina respecto a otros aislados. En comparación a la cepa tipo PAO1, la cantidad de este compuesto llega a ser 40 veces mayor. Además, los niveles de piocianina son mayores cuando la cepa ID4365 crece a 30°C, lo cual contrasta con la cepa PAO1 que produce una mayor cantidad a 37°C.

Con el fin de analizar este fenómeno, se midió la actividad transcripcional de los operones *phzA1B1C1D1E1F1G1* y *phzA2B2C2D2E2F2G2*, así como del gen *phzM* (todos ellos involucrados en la síntesis de piocianina). Los resultados obtenidos mostraron que, en comparación a PAO1, existe una sobreexpresión de cada una de estas enzimas en ID4365. Además, la actividad transcripcional de éstas es mayor a 37°C que a 30°C. Como consecuencia, la expresión diferencial de los operones *phzABCDEFG* y del gen *phzM* permite explicar la sobreproducción de piocianina en ID4365 respecto a PAO1, mas no el aumento que presentan los niveles de este compuesto a 30°C.

Adicionalmente, tras medir los niveles de ácido fenazin-1-carboxílico (PCA), un intermediario en la biosíntesis de piocianina, se detectó una sobreproducción de este compuesto en la cepa ID4365. Aún más, los niveles máximos de PCA se observaron a 30°C. Así, el aumento en los niveles de piocianina a esta temperatura está directamente relacionado con un aumento en la producción de PCA.

Introducción

1. Biología de *Pseudomonas aeruginosa*

Descrita por primera vez en 1882, *Pseudomonas aeruginosa* es una gammaproteobacteria ampliamente distribuida en la naturaleza. Se ha aislado de ambientes terrestres y acuáticos, así como de plantas y animales (Goldberg, 2000). Puede crecer a temperaturas que van de los 4°C a los 42°C (Palleroni, 1984). A pesar de ser una bacteria de vida libre, cuenta con la capacidad de infectar a una diversa gama de organismos, incluyendo levaduras (Hogan & Kotler, 2002), nemátodos (Mahajan *et al.*, 1999), insectos (Jander *et al.*, 2000), plantas (Rahme *et al.*, 1995) y mamíferos (Hammer *et al.*, 2003). En seres humanos, actúa como patógeno oportunista, *i.e.*, como un organismo que aprovecha fallas en los sistemas de defensa para iniciar una infección. La variedad de tejidos que puede afectar es muy amplia, siendo las infecciones más comunes las de córnea, piel, tracto urinario y sistema respiratorio (Bodey *et al.*, 1983). Dada la naturaleza oportunista de esta bacteria, dichas infecciones afectan fundamentalmente a pacientes inmunosuprimidos. De hecho, *P. aeruginosa* es considerada una de las causas principales de sepsis y muerte en individuos con quemaduras graves (Rumbaugh *et al.*, 1999), cáncer (Bergen & Shelamer, 1996) y SIDA (Dropulic *et al.*, 1995). A su vez, representa el mayor problema clínico para pacientes con fibrosis quística, provocando la muerte prematura del 80% de éstos (Spiker *et al.*, 2004). Por último, *P. aeruginosa* es una fuente importante de infecciones nosocomiales, principalmente en unidades de terapia intensiva (Richards *et al.*, 1999).

Existen varios elementos que contribuyen a la patogenicidad de *P. aeruginosa*. En primer lugar, como miembro de la familia *Pseudomonadaceae*, esta bacteria presenta una amplia versatilidad metabólica. Se estima que puede utilizar alrededor de 80 compuestos orgánicos como fuente de energía y carbono (Palleroni, 1984). Asimismo, a pesar de estar clasificada como un organismo

aerobio obligado, se ha comprobado que algunas cepas pueden crecer anaeróbicamente a través de la desnitrificación (Eschbach, *et al.*, 2004). Como resultado, sus requisitos nutricionales son relativamente simples. Lo anterior facilita su persistencia en catéteres, dispositivos respiratorios, válvulas cardíacas, soluciones antisépticas débiles e, incluso, en agua destilada (Brewer *et al.*, 1996; Hardalo & Edberg, 1997).

Por otra parte, *P. aeruginosa* cuenta con múltiples mecanismos de resistencia a antibióticos. Entre ellos destacan la baja permeabilidad de su membrana externa, la capacidad de expresar β -lactamasas y la presencia de bombas de eflujo. Estos mecanismos proveen una resistencia intrínseca a una variedad considerable de agentes antimicrobianos, la cual puede ampliarse fácilmente a través de mutaciones que deriven en la resistencia a nuevos antibióticos (Livermore, 2001). Adicionalmente, *P. aeruginosa* es capaz de formar biopelículas, comunidades bacterianas asociadas a una superficie. Dichas comunidades se caracterizan por secretar una matriz polimérica protectora, la cual aumenta aún más la resistencia a antibióticos (Drenkard, E. 2003). Todo lo anterior tiene como consecuencia que el tratamiento contra *P. aeruginosa* no sea fácil y pueda derivar en el surgimiento de cepas multirresistentes.

Finalmente, *P. aeruginosa* cuenta con un gran arsenal de factores de virulencia. Algunos, como lectinas y pili tipo IV se encuentran asociados a la célula; mientras que otros, como proteasas, exotoxinas y piocianina, son secretados al medio extracelular. Cada uno de estos factores tiene una función específica: unos intervienen en las primeras interacciones con el hospedero, otros facilitan la invasión de los tejidos y otros más promueven el establecimiento de la infección (Lyczak *et al.*, 2000). De esta forma, la acción acumulativa de los diferentes factores de virulencia es un factor clave detrás de la patogenicidad de esta bacteria (Lee *et al.*, 2006).

2. Piocianina

Un factor de virulencia importante en *P. aeruginosa* es la piocianina, un metabolito secundario pigmentado que confiere un color azul-verdoso a las colonias de esta especie. Dicho metabolito pertenece al grupo de las fenazinas, compuestos aromáticos nitrogenados que presentan una alta actividad biológica. Específicamente, como se observa en la Fig. 1, la piocianina (o 5-metilfenazin-1-ona) presenta una estructura tricíclica con un grupo metilo y un grupo hidroxilo (Mavrodi *et al.*, 2001).

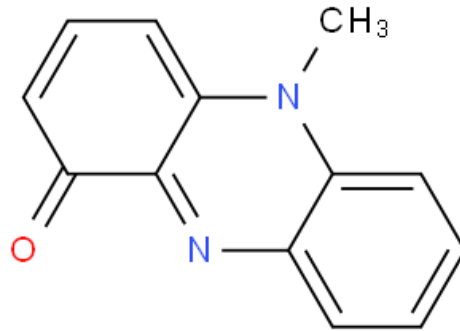


Figura 1. Estructura química de la piocianina

La producción de piocianina juega un papel crucial en la patogénesis de *P. aeruginosa*. Estudios con modelos murinos han demostrado que, a diferencia de las cepas silvestres, las cepas mutantes incapaces de producir esta fenazina no pueden establecer una infección pulmonar crónica o aguda (Lau *et al.*, 2004). Esto se debe en parte a que, durante el crecimiento de esta bacteria en vías respiratorias, la piocianina puede ser reducida a través de la oxidación de glutatión y NADH. Lo anterior conlleva a un aumento en los niveles de oxidación y, como resultado, a la generación de estrés oxidativo en las células epiteliales del hospedero (Lau *et al.*, 2004b).

Adicionalmente, la piocianina reducida puede reaccionar con el oxígeno libre presente en los pulmones, formando especies reactivas de oxígeno que afectan varias funciones celulares. Estudios *in vitro* han revelado que este mecanismo inhibe la respiración celular, la función ciliar, el crecimiento de células epidérmicas y la liberación de prostaciclina (Sorensen *et al.*, 1987; Kamath *et al.*, 1995). Además, puede interrumpir la homeostasis de calcio e inducir la apoptosis de neutrófilos (Denning *et al.*, 1998) Todo esto favorece la invasión de tejidos, promueve el establecimiento de la enfermedad y, como consecuencia, contribuye a la virulencia (Lyczak *et al.*, 2000).

Por otra parte, la piocianina puede inhibir el crecimiento de microorganismos competidores durante infecciones mixtas. De hecho, existe una fuerte correlación entre la producción de este metabolito secundario y una baja incidencia de infecciones fúngicas. Específicamente, se ha visto que la piocianina suprime el crecimiento de la fase virulenta de *Candida albicans* (Cogen *et al.*, 2009). De esta forma, los efectos de esta fenazina en el hospedero pueden ser simultáneamente positivos y negativos.

Además de todas estas funciones, la piocianina funge como molécula señalizadora en *P. aeruginosa*. Análisis transcriptómicos han demostrado que esta fenazina altera la expresión de 51 genes durante la fase estacionaria de crecimiento. Entre éstos, se encuentran genes relacionados con procesos de transporte, bombas de eflujo, control redox y adquisición de hierro. Los genes de bombas de eflujo *mexGHI-opmD* y el gen de monooxigenasa PA2274 se encuentran entre los genes regulados más fuertemente (Dietrich *et al.*, 2006).

2.1. Biosíntesis

La biosíntesis de piocianina es una ramificación de la vía del shikimato, la ruta metabólica responsable de la producción de los aminoácidos aromáticos en bacterias y plantas. El ácido corísmico, uno de los compuestos intermedios de

esta vía, sirve como precursor de la estructura básica de las fenazinas. A partir de éste, la síntesis de piocianina se da en dos fases: la conversión de ácido corísmico a ácido fenazin-1-carboxílico (PCA) y la conversión de PCA a piocianina.

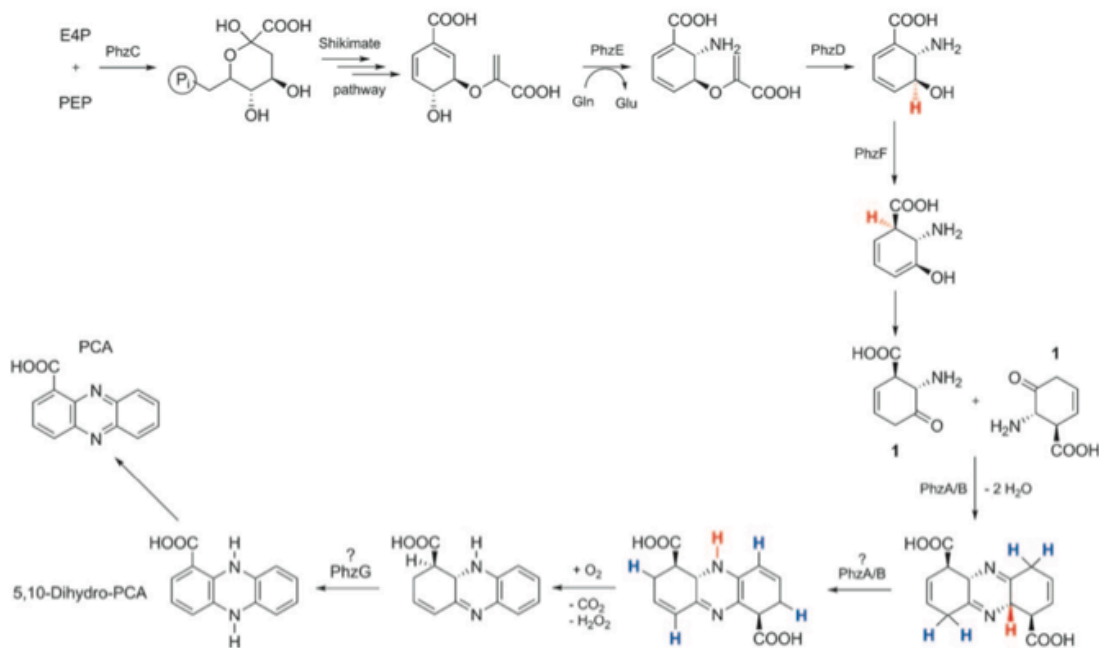


Figura 2. Biosíntesis de PCA (Modificada a partir de Mentel *et al.*, 2009)

Durante la primera fase (Fig.2), el ácido corísmico es convertido en 2-amino-2-desoxiisocorismato (ADIC) por PhzE, un homólogo de la antranilato sintasa. Enseguida, la isocorismatasa PhzD hidroliza el ADIC en ácido *trans*-2,3-dihidro-3-hidroxiantranílico (DHHA) y piruvato. A su vez, el DHHA sirve como sustrato para PhzF, una isomerasa que lo transforma a ácido 6-amino-5-oxociclohex-2-ene-1-carboxílico. Subsecuentemente, dos moléculas de este compuesto se autocondensan para formar un precursor tricíclico. Dicha reacción es catalizada por un heterodímero formado por PhzA y PhzB. El precursor resultante se rearregla y deriva en un compuesto intermedio con cuatro dobles enlaces conjugados, el cual sufre una descarboxilación oxidativa. Finalmente, el producto resultante sufre una oxidación, convirtiéndose en ácido 5,10-dihidrofenzazina-1-carboxílico, el cual constituye la forma reducida del PCA. Se ha especulado que

PhzG es la encargada de mediar este último paso (Mentel *et al.*, 2009; Pierson & Pierson, 2010; Thomas *et al.*, 2002).

En algunas especies de *Pseudomonas*, los genes que codifican las seis enzimas anteriores se encuentran organizados en un operón compuesto por siete cistrones: *phzABCDEFG*. *P. aeruginosa* presenta dos copias de este operón, lo cual puede ser una de las razones detrás de la alta producción de fenazinas que presenta esta especie (Mavrodi *et al.*, 2001). Cabe señalar que el gen *phzC* codifica para una proteína homóloga a las 3-desoxi-D-arabinoheptolusonato-7-fosfato (DAHP) sintetasas, enzimas que participan en la producción de shikimato. Como consecuencia, se ha propuesto que PhzC permite asegurar que se destine el suficiente flujo metabólico a la biosíntesis de fenazinas aún cuando otras DAHP sintetasas estén inhibidas (Thomas *et al.*, 2002).

La biosíntesis de piocianina a partir de PCA consta de dos pasos (Fig. 3). En primer lugar, PhzM, una metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina, cataliza la N-metilación de PCA (Parsons *et al.*, 2007). Inmediatamente después, el compuesto resultante, 5-metil-PCA, es hidroxilado por PhzS, una hidroxilasa dependiente de flavina (Greenhagen *et al.*, 2008). El producto de esta última reacción es la piocianina.

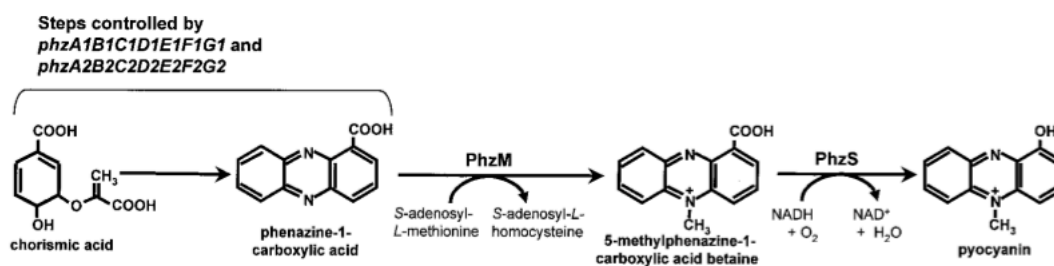


Figura 3. Biosíntesis de piocianina a partir de PCA (Modificada a partir de Mavrodi *et al.*, 2001)

En *P. aeruginosa*, los genes que codifican para estas dos enzimas flanquean al operón *phzA1B1C1D1E1F1G1*. El gen *phzM* se localiza 695 pb río arriba y se transcribe divergentemente, mientras que *phzS* se ubica 236 pb río abajo y se transcribe en el mismo sentido (Mavrodi *et al.*, 2001).

2.2. Regulación por temperatura de la producción de piocianina

La producción de piocianina varía dependiendo la temperatura de crecimiento de *P. aeruginosa*. Por ejemplo, en la cepa PAO1, los niveles de producción de este compuesto son mayores cuando la bacteria crece a 37°C que cuando crece a 28°C (Huang *et al.*, 2009). Dicho patrón se observa también en PA14, un aislado clínico altamente virulento (Wurtzel *et al.*, 2012) Considerando la naturaleza patógena de ambas cepas, se ha propuesto que el incremento en la producción de este factor de virulencia es una adaptación que favorece la supervivencia de *P. aeruginosa* en mamíferos, los cuales presentan una temperatura corporal promedio de 37°C. De hecho, este fenómeno se ha observado en genes de virulencia de otras bacterias patógenas de mamíferos (Konkel & Tilly, 2000).

Sin embargo, este patrón de producción no es universal para todas las cepas de *P. aeruginosa*. Estudios con aislados ambientales han demostrado que el patrón puede ser totalmente inverso (Soberón, datos no publicados). Inclusive, en algunos casos, se ha observado que la piocianina ni siquiera es la fenazina predominante. En la cepa M18, aislada de la rizósfera de melón, la relación PCA-piocianina es de 105:1 a 28°C y de 5:1 a 37°C. En contraste, en la cepa tipo PAO1, la piocianina es predominante en una relación 2:1. Además, los niveles absolutos de PCA en M18 son 9 veces más altos que en la PAO1, mientras que los niveles de piocianina en PAO1 son 3.5 veces más altos que en M18 (Huang *et al.*, 2009)

3. “Quorum sensing”

La síntesis de piocianina en *P. aeruginosa* es regulada por “quorum sensing”, un mecanismo de comunicación intercelular que permite coordinar la expresión de varios genes en una población de bacterias. Dicho mecanismo está basado en la acumulación de una molécula señalizadora (o autoinductor) que, al ser producida por las mismas bacterias, refleja la densidad poblacional de éstas (Fuqua *et al.*, 2001)

3.1. “Quorum sensing” en *Aliivibrio fischeri*

El “quorum sensing” fue descrito por primera vez en *Aliivibrio fischeri*¹, una bacteria bioluminiscente en la que la producción de luz es regulada por este mecanismo (Fig. 4). El sistema molecular básico es mediado únicamente por dos proteínas: LuxI y LuxR. LuxI es una sintasa citoplásmica responsable de la síntesis de *N*-3-oxo-hexanoil homoserina lactona (3O-C₆-HSL), la molécula señalizadora cuya concentración es proporcional al número de células. Por su parte, LuxR es un regulador transcripcional que interactúa directamente con 3O-C₆-HSL cuando ésta ha llegado a su concentración crítica. El resultado de esta interacción es la formación del complejo LuxR/3O-C₆-HSL, el cual reconoce una secuencia específica de DNA (la caja *lux*) en la región regulatoria del operón *lux/CDABE* y activa su transcripción. En dicho operón, además del gen que codifica para la sintasa LuxI, se encuentran los genes involucrados en la bioluminiscencia (Greenberg, 1997; Hastings & Greenberg, 1999). Cabe señalar que LuxR reconoce la caja *lux* únicamente cuando se encuentra unido a 3O-C₆-HSL (Egland & Greenberg, 2000).

¹ Antes clasificada como *Vibrio fischeri* (Urbanczyk *et al.*, 2007)

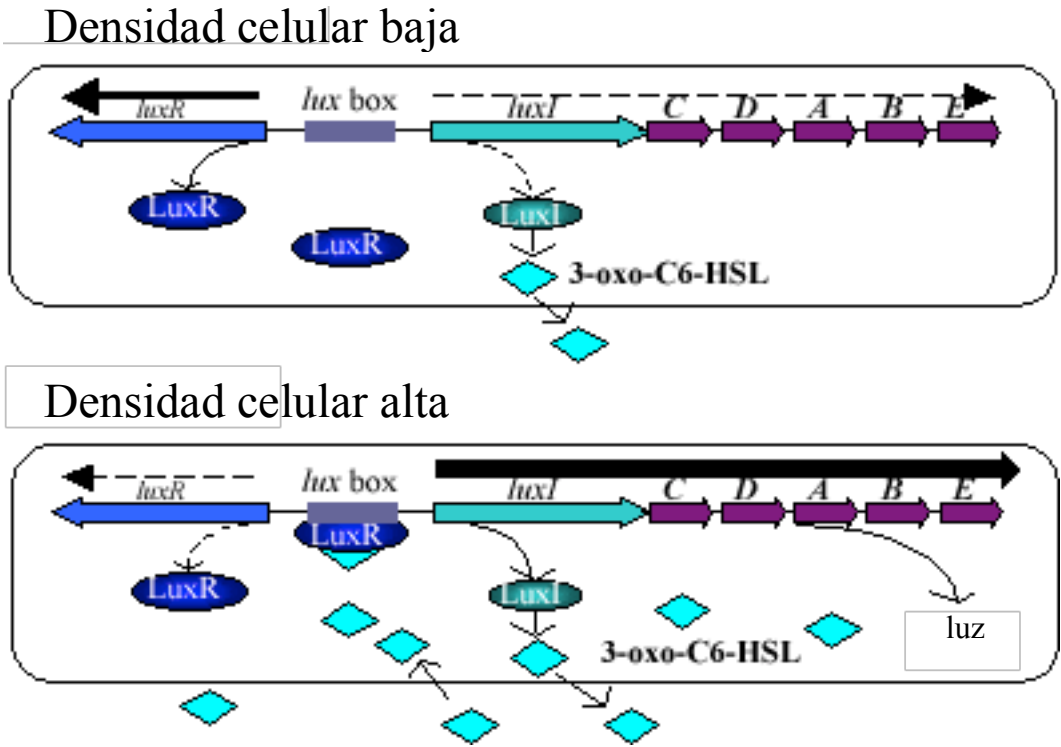


Figura 4. Representación esquemática de la regulación por “quorum sensing” en *A. fischeri* (Modificada a partir de Diggle & Atkinson, 2011).

Los elementos anteriores permiten describir el proceso regulatorio a lo largo de la curva de crecimiento de *A. fischeri*. En primer lugar, cuando la densidad celular es baja, la producción constitutiva de LuxI es mínima. Como consecuencia, la cantidad de 3O-C₆-HSL es insuficiente para que se dé la interacción con el regulador LuxR. Siguiendo el gradiente de concentración, la molécula señalizadora es difundida fuera de la célula y, dado que los órganos luminosos donde reside *A. fischeri* son espacios confinados, ésta comienza a acumularse en el medio extracelular conforme el número de bacterias aumenta. De esta forma, cuando la densidad celular es lo suficientemente alta, los niveles de autoinductor llegan a un punto crítico en el que se tienen las cantidades necesarias para que se forme el complejo LuxR/3O-C₆-HSL. En ese momento, se activa la transcripción del operón *luxI*CDABE. Tomando en consideración que el gen *luxI* forma parte de dicho operón, lo anterior genera una retroalimentación positiva que amplifica la señal y

asegura la sincronización de la respuesta celular (*i.e.*, la producción de luz) en toda la comunidad bacteriana (Dunlap, 1999).

3.2. “Quorum sensing” en *Pseudomonas aeruginosa*

A diferencia de *A. fischieri*, *P. aeruginosa* cuenta con dos sistemas de “quorum sensing”: los sistemas Las y Rhl (Fig. 5). El primero de ellos responde a la molécula señalizadora *N*-3-oxo-dodecanoil homoserina lactona (3O-C₁₂-HSL), producida por la sintasa LasI y reconocida por el regulador transcripcional LasR. Por su parte, el sistema Rhl utiliza el autoinductor *N*-butanoil homoserina lactona (C₄-HSL), producido por la sintasa RhlI y reconocido por el regulador RhlR. Tanto LasI como RhlI son homólogos de LuxI, mientras que LasR y RhlR son homólogos de LuxR (Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). La secuencia de DNA que reconocen estos dos reguladores transcripcionales es conocida como caja *las* y es muy similar a la caja *lux* de *A. fischieri* (Gray *et al.*, 1994).

Se ha estimado que del 3 al 11% del genoma de *P. aeruginosa* es regulado por estos dos sistemas (Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). El complejo LasR/3O-C₁₂-HSL controla la producción de múltiples factores de virulencia incluyendo las elastasas LasA (*lasA*) y LasB (*lasB*), exotoxina A (*toxA*), proteasa alcalina (*aprA*), ácido cianhídrico (*hcnABC*) y ramnolípidos (*rhlG*). A su vez, el complejo RhlR/ C₄-HSL activa la transcripción de genes relacionados con la producción de lectina (*lecA*), ácido cianhídrico (*hcnABC*), ramnolípidos (*rhlAB* y *rhlC*) y piocianina (Soberón-Chávez *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, 2012). En este último caso, solamente el operón *phzA1B1C1D1E1F1G1* cuenta con una caja *las*, la cual comparte con el gen *phzM*. Adicionalmente, en contraste con LuxR y LasR, RhlR puede unirse a las secuencias regulatorias de algunos genes sin necesidad de formar un complejo con su autoinductor. Se ha comprobado que, cuando esto ocurre, RhlR reprime la expresión de los genes *rhlAB*, *lasB* y *rhlR* (Medina *et al.*, 2003).

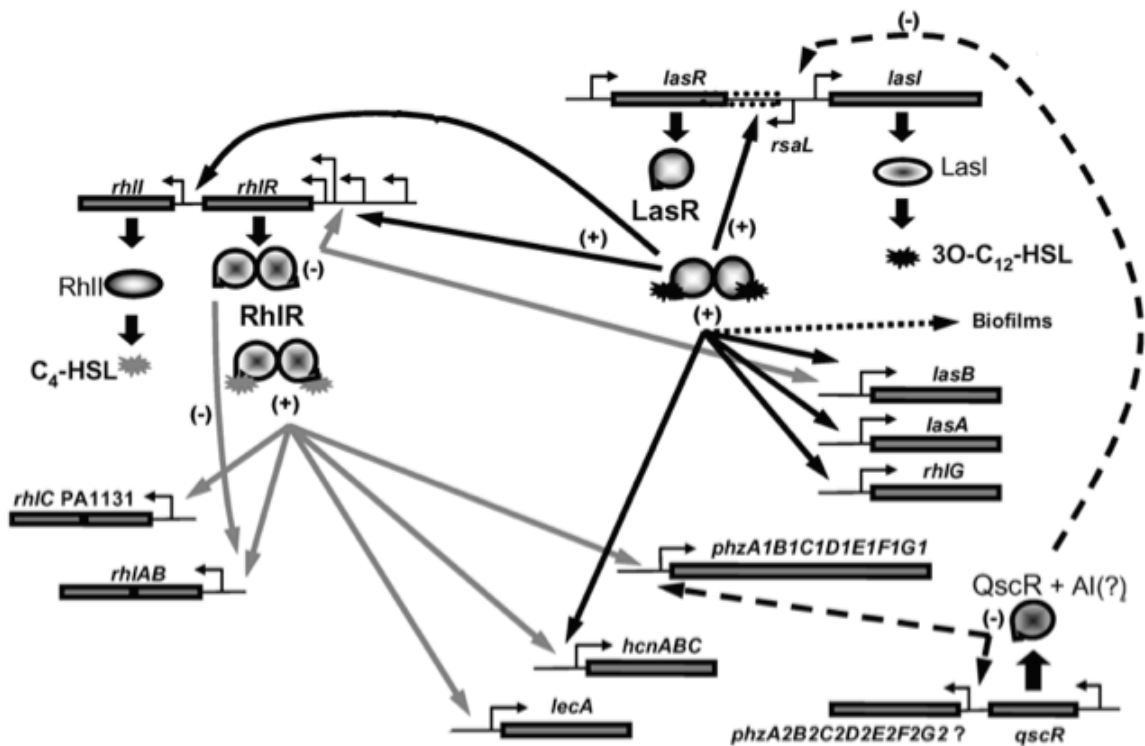


Figura 5. Representación esquemática de la red genética involucrada en el “quorum sensing” de *Pseudomonas aeruginosa* (Modificada a partir de Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

Finalmente, es necesario destacar que los sistemas Las y Rhl no son independientes el uno del otro, sino que forman una cascada regulatoria en la que el complejo LasR/3O-C₁₂-HSL activa la expresión de *rhlR* y *rhlI*. De esta forma, la activación del sistema Las permite la posterior activación del sistema Rhl (Pesci *et al.*, 1997). Dicha jerarquización hace que la regulación por quorum sensing en *P. aeruginosa* sea considerablemente compleja.

Aunado a lo anterior, *P. aeruginosa* produce un tercer homólogo de LuxR denominado QscR (quorum-sensing control repressor). Este factor transcripcional, además de tener un dominio de unión a DNA, presenta un dominio de unión a autoinductor. Sin embargo, a diferencia de LasR y RhIR, no existe una contraparte homóloga a LuxI que sintetice una molécula señalizadora específica para este factor. Como consecuencia, QscR es considerado un receptor huérfano. A pesar de ello, se ha reportado que QscR puede regular negativamente la expresión de

algunos genes controlados por “quorum sensing”, tales como aquellos involucrados en la producción de 3O-C₁₂-HSL (*lasI*), ácido cianhídrico (*hcnABC*), elastasa (*lasB*) y piocianina. En este último caso, QscR puede reprimir tanto al operón *phzA1B1C1D1E1F1G1* como al operón *phzA2B2C2D2E2F2G2*, sufriendo el segundo una mayor inhibición (Fuqua, 2006; Lequette *et al.*, 2006).

El mecanismo detrás de la represión de estos genes no ha sido bien definido, sin embargo se ha demostrado que QscR puede formar heterooligómeros con RhlR y LasR. Adicionalmente, existe evidencia de que QscR puede interactuar con 3O-C₁₂-HSL y C₄-HSL, Por tanto, es posible que QscR, al secuestrar a dichos factores transcripcionales y autoinductores, pueda modular la actividad regulatoria de los sistemas Las y Rhl (Lee *et al.*, 2006).

4. Diversidad genómica dentro de *Pseudomonas aeruginosa*

El primer genoma de *P. aeruginosa* en ser secuenciado fue el de la cepa tipo PAO1, un aislado clínico obtenido en 1955. Con un tamaño de 6.3 Mpb y un contenido G+C de 66.6%, el genoma de esta cepa cuenta con una región codificante que abarca el 89.4%. En esta región, se ha predicho la existencia de 5570 genes. Considerando que los genomas bacterianos presentan un tamaño promedio de ~4 Mpb y que los genomas de eucariontes simples codifican alrededor de 6200 proteínas, los datos anteriores sugieren que el genoma de *P. aeruginosa* es considerablemente grande (Stover *et al.*, 2000).

Aunado a lo anterior, el genoma de la cepa PAO1 presenta una amplia diversidad funcional. El análisis bioinformático de su región codificante revela que un alto porcentaje de los genes se encuentra relacionado con el metabolismo, transporte y flujo de compuestos orgánicos; así como con procesos quimiotácticos y de secreción. Aunado a esto, el 9.4% de los genes forma parte de sistemas de regulación, especialmente sistemas de dos componentes. Como consecuencia, aproximadamente 1 de cada 10 genes participa en actividades regulatorias (Stover

et al., 2000). De esta forma, el amplio espectro de capacidades bioquímicas, fisiológicas, patogénicas y regulatorias de *P. aeruginosa* está sustentado por un genoma sumamente complejo.

Por otra parte, estudios comparativos entre distintas cepas de *P. aeruginosa* han demostrado que existe un alto grado de conservación en el contenido genómico de esta especie (Spencer *et al*, 2003). Dicha conservación se ha registrado incluso entre aislados clínicos y ambientales. Por ejemplo, tras realizar microarreglos de DNA a 18 cepas distintas, Wolfgang *et al.* (2003) observaron que la fracción de genes de PAO1 presentes en éstas va del 96.1% al 97.7%, compartiéndose el 93.4% (5183 genes) entre todas ellas. Además, registraron una alta conservación (97%) de los genes relacionados con virulencia. Tomando en cuenta que algunas de las cepas estudiadas provenían de fuentes ambientales, este resultado indica que probablemente existen presiones selectivas que mantienen rasgos de virulencia en ambientes no clínicos. Aún más, dicha conservación sugiere que las cepas ambientales pueden contar con la capacidad de causar infecciones en humanos.

Antecedentes

La cepa ID4365 de *P. aeruginosa* es un aislado ambiental, proveniente del Mar de Goa, con potencial para servir como agente de control biológico (Manwar *et al.*, 2003). En el laboratorio de la Dra. Gloria Soberón Chávez, se ha mandado secuenciar el genoma de esta cepa. A pesar de que el armado de dicho genoma se encuentra en una etapa preliminar, con 6 820 970 pb dispuestos en 818 contigs, se ha podido calcular que el contenido G+C es de 65.65% y que el número de secuencias codificantes es de 6 194. Además, como se observa en la Fig. 6, análisis bioinformáticos han revelado un alto grado de similitud entre el genoma de esta cepa y el de PAO1. Este último dato coincide con la alta conservación genómica registrada en esta especie.

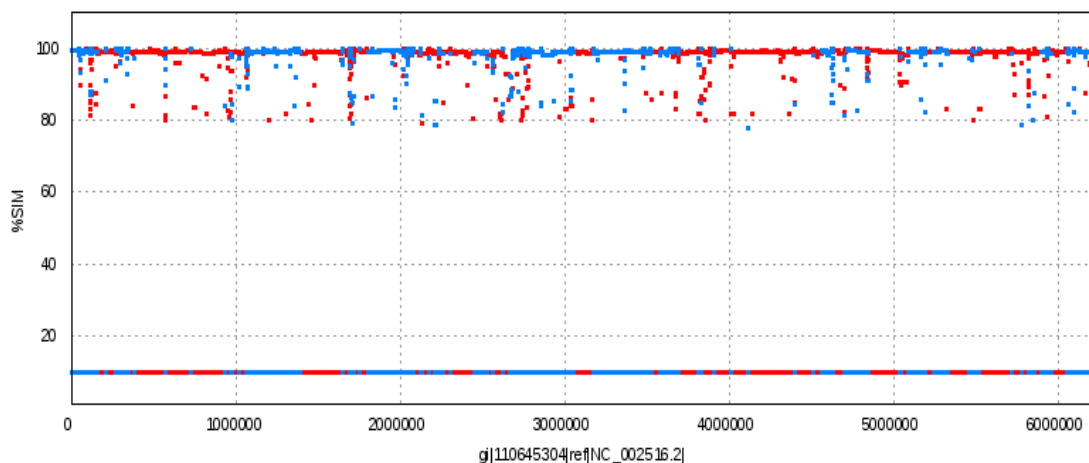


Figura 6. Porcentaje de identidad entre los genomas de *P. aeruginosa* ID4365 y *P. aeruginosa* PAO1. Los puntos azules son alineamientos en sentido original de la secuencia del contig, mientras que los puntos rojos son alineamientos por inversión en la orientación de las secuencias. La línea basal representa el consenso que se puede armar entre el genoma de referencia (PAO1) y el conjunto de contigs (ID4365).

Adicionalmente, se ha evaluado la virulencia de esta cepa en un modelo murino. Los resultados obtenidos (Tabla 1) muestran que, si bien la virulencia es menor a la registrada en PAO1, ID4365 cuenta con la capacidad de establecer una infección y matar a su hospedero.

Tabla 1. Virulencia en modelo murino a diferentes dosis (Soberón, datos no publicados)

Cepa	Porcentaje de letalidad (10^8)	Porcentaje de letalidad (10^9)	Porcentaje de letalidad (10^{10})
PAO1	100	100	100
ID4365	60	80	100

Por último, se han caracterizado los niveles de producción de piocianina en *P. aeruginosa* ID4365. Los datos obtenidos indican que, en comparación con otros aislados ambientales y clínicos, dicha cepa exhibe una sobreproducción. De hecho, respecto a la cepa PAO1, la cantidad máxima llega a ser hasta 37 veces mayor. Aunado a esto, el patrón de producción es opuesto al de PAO1, siendo los niveles a 30°C mayores que a 37°C (Tabla 2)

Tabla 2. Producción de piocianina ($\mu\text{g/mL}$) en PAO1 e ID4365 tras 24 horas de crecimiento a 30°C y 37°C (Soberón, datos no publicados)

Cepa	30°C	37°C
PAO1	2.34 \pm 0.46	5.29 \pm 0.23
ID4365	197.2 \pm 6	24.5 \pm 1.5

Este fenómeno plantea problemas de investigación interesantes: ¿Cuál es la razón detrás de la sobreproducción de piocianina en la cepa ID4365? ¿Por qué los niveles de este compuesto son mayores cuando la cepa ID4365 crece a 30°C? Debido a que la biosíntesis de este compuesto implica la participación de varios genes y la regulación de éstos por “quorum sensing”, existen múltiples hipótesis que podrían abordarse para tratar de contestar estas preguntas. En este trabajo, se decidió evaluar si el nivel de expresión de los operones *phzA1B1C1D1E1F1G1*, *phzA2B2C2D2E2F2G2* y del gen *phzM* explica la sobreproducción de piocianina en la cepa ID436

Hipótesis

- La sobreproducción de piocianina en la cepa ID4365 de *P. aeruginosa* se debe a una mayor transcripción de los operones *phzABCDEFG* y del gen *phzM* respecto a la cepa PAO1, y esta diferencia es mayor a 30°C.

Objetivos

Objetivo general

- Analizar el papel de la actividad transcripcional de los operones *phzA1B1C1D1E1F1G1* y *phzA2B2C2D2E2F2G2*, así como del gen *phzM*, en la sobreproducción de piocianina en *Pseudomonas aeruginosa* ID4365

Objetivos particulares

- Medir los niveles de transcripción de los operones *phz* y del gen *phzM* en PAO1 e ID4365 a 30°C y 37°C.
- Medir los niveles de piocianina y ácido fenazin-1-carboxílico (PCA) en PAO1 e ID4365 a 30°C y 37°C.
- Medir los niveles de *N*-butanoil homoserina lactona (C₄-HSL) en PAO1 e ID4365 a 30°C y 37°C

Materiales y métodos

1. Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Tabla 3. Cepas bacterianas empleadas en este trabajo

Cepa	Características	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Tipo silvestre	Stover <i>et al.</i> , 2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ID4365	Tipo silvestre	Manwar <i>et al.</i> , 2003
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR</i> λ (ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15)	Grant <i>et al.</i> , 1990
<i>Chromobacterium violaceum</i> 026	Km ^R Hg ^R , doble mutante de mini-Tn5, derivada de <i>C. violaceum</i> ATCC 31532, biosensor de homoserina lactonas	Latifi <i>et al.</i> , 1995

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Características	Referencia
pUC18	Amp ^R ; alto número de copias; contiene un fragmento de <i>lacZ</i> que puede ser interrumpido si se clona un fragmento de DNA en el sitio de policlación; permite la identificación sencilla de plásmidos recombinantes.	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pMP220	Tc ^R ; derivado de pTJS75; contiene el gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> precedido por un sitio de policlación proveniente de pIC20H ; es empleado para construir fusiones transcripcionales	Spaink, 1987

pMP1CS	Tc ^R ; derivado de pMP220; tiene clonado un fragmento de 479 pb que abarca desde el nucleótido -295 hasta el +184 relativo al sitio de inicio de la transcripción de <i>phzA2</i> de PAO1.	Este trabajo
pMP2CS	Tc ^R ; derivado de pMP220; tiene clonado un fragmento de 479 pb que abarca desde el nucleótido -295 hasta el +184 relativo al sitio de inicio de la transcripción de <i>phzA2</i> de ID4365.	Este trabajo
pMP3CS	Tc ^R ; derivado de pMP220; tiene clonado un fragmento de 700 pb que abarca desde el nucleótido -450 hasta el +250 relativo al sitio de inicio de la transcripción de <i>phzM</i> de PAO1.	Este trabajo
pMP4CS	Tc ^R ; derivado de pMP220; tiene clonado un fragmento de 700 pb que abarca desde el nucleótido -450 hasta el +250 relativo al sitio de inicio de la transcripción de <i>phzM</i> de ID4365.	Este trabajo
pMP_phzA1	Tc ^R ; derivado de pMP220; tiene clonado un fragmento de 740 pb que abarca desde el nucleótido -328 hasta el +412 relativo al sitio de inicio de la transcripción de <i>phzA1</i> de PAO1.	Gloria Soberón
pMP_lecA	Tc ^R ; derivado de pMP220, tiene clonado un fragmento de 625 pb que abarca desde el nucleótido -422 hasta el +203 relativo al sitio de inicio de la transcripción de <i>lecA</i> de PAO1.	Gloria Soberón

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de restricción
qscR	CAAGCTCAACTCCAGCAACA	---
phzA	GCTTTCCGTGGTCCAGTTG	---
phzM	TATCAAATTACGCGCAGCAG	---
phz2DER	TGCTCTAGAGTTCGAATCGACTGGCATC	XbaI
phz2IZQ	CGGAATTTCGCTGCTCAACTGAATCGAC	EcoRI
phzMRWD	TGCTCTAGACATTTCCGTAACCCGAGA	XbaI
phzMFWD	CGGAATTCTTCCCTGTACCGCTGACC	EcoRI

2. Curvas de crecimiento y producción de piocianina.

Se crecieron cultivos de las cepas PAO1 e ID4365 en medio PPGAS (Apéndice 2). Los cultivos se inocularon a una densidad óptica de 0.1 a 600 nm y se incubaron en matraces de 500 mL a 30°C y 37°C con una agitación de 200 rpm. Se tomaron muestras cada 2 horas durante 24 horas. En cada una se midió la concentración celular y la producción piocianina. Para medir la concentración celular, se recuperó 1 mL de cultivo y se leyó la densidad óptica de éste a 600 nm. Para medir la piocianina, se centrifugó 1 mL de cultivo (13500 rpm por 1.5 minutos) y se recuperó el sobrenadante; posteriormente, se leyó la absorbancia de éste a 690 nm.

3. Construcción de las fusiones transcripcionales.

Se amplificaron los fragmentos correspondientes para cada fusión transcripcional mediante PCR (Apéndice 3.5). Para los plásmidos pMP1CS y pMP2CS, se utilizaron los oligonucleótidos phz2DER y phz2IZQ; para los plásmidos pMP3CS y pMP4CS se emplearon los oligonucleótidos phzMRWD y phzMFWD. En todos los casos se utilizó la enzima Pfu Ultra (Agilent) y se corrieron 100 µL de reacción. Para cada fusión, los productos de PCR, así como 2.5 µg del vector pUC18, se

digirieron con las enzimas XbaI y EcoRI; posteriormente, se corrieron en un gel de agarosa LMP y se purificaron (Apéndice 3.6). Tras concentrar cada uno de estos elementos en 10 μ L de agua estéril, se realizó una ligación de los extremos cohesivos con ayuda de la DNA ligasa de T4 (Apéndice 3.7).

La ligación se extrajo con fenol cloroformo, se precipitó y se resuspendió en 6 μ L de Tris-EDTA (TE) 10mM. De éstos, 2 μ L se emplearon para electroporar células competentes de *Escherichia coli* DH5 α (Apéndice 3.3). Las células transformadas se plaquearon en LB (Apéndice 2) con tetraciclina (10 μ g/mL) e IPTG, y se incubaron a 37°C. Después de 24 horas, se identificaron las colonias blancas (aquellas en las que el gen *lacZ* del pUC18 había sido interrumpido) y se crecieron 6 de ellas con el fin de obtener minipreparaciones de plásmido (Apéndice 3.2). Los plásmidos purificados se digirieron con las enzimas XbaI y EcoRI para comprobar la presencia del fragmento clonado. Tras identificar las colonias que cumplían con lo anterior, se creció una de ellas en 100 mL de medio YT2X (Apéndice 2) con tetraciclina (10 μ g/mL) y se purificó el plásmido. El plásmido purificado se mandó secuenciar a la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular (UNAM)

Habiendo comprobado la identidad de las secuencias clonadas en cada plásmido, se construyeron las fusiones transcripcionales. Para ello, se restringieron 15 μ g de cada uno de los plásmidos derivados de pUC18, así como 2.5 μ g del vector pMP220 con XbaI y EcoRI. Posteriormente, se siguió el mismo procedimiento empleado para las clonaciones previas. Sin embargo, dado que el pMP220 no cuenta con un sistema de identificación de plásmidos recombinantes, las células de *E. coli* DH5 α transformadas se plaquearon en LB con tetraciclina (10 μ g/mL). Después de 24 horas, se eligieron 6 de ellas al azar para obtener minipreparaciones de plásmido y evaluar por restricción los plásmidos.

4. Ensayos de expresión

Los plásmidos derivados del pMP220 con las fusiones transcripcionales se introdujeron en las cepas PAO1 e ID4365 por electroporación (Apéndice 3.4). Posteriormente, se crecieron cultivos de cada una de las cepas transformadas en medio PPGAS con tetraciclina (150 µg/mL). Los cultivos se inocularon a una densidad óptica de 0.1 a 600 nm y se incubaron en matraces de 500 mL a 30°C y 37°C con una agitación de 200 rpm. Se tomaron muestras en cinco momentos diferentes: las primeras dos se recolectaron cuando la densidad óptica de los cultivos llegó a 0.4, y a 1.0; las últimas tres se tomaron 12, 24 y 36 horas después del segundo punto. En cada una de las muestras, se midió la producción de pirocianina y la actividad de β-galactosidasa. Los ensayos se realizaron por triplicado a 30°C y 37°C usando un mismo lote de medio PPGAS.

4.1. Medición de β-galactosidasa

La medición de β-galactosidasa se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Miller (1972). Para cada muestra, se midió la densidad óptica del cultivo a 600 nm. Posteriormente, se centrifugó 1 mL (13500 rpm por 1 minuto), se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 1 mL de buffer Z (Apéndice 2). En un tubo Eppendorf, se agregaron 200 µL del concentrado celular, 800 µL de Buffer Z / SDS (0.01%) / β-mercaptoetanol (0.05%) y 10 µL de cloroformo. Se agitó por 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Enseguida, se adicionaron 200 µL de *orto*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (4 mg/mL) y se agitó con vórtex por 5 segundos. La muestra se incubó a temperatura ambiente el tiempo necesario para obtener un color amarillo claramente visible. En ese momento, la reacción se detuvo adicionando 500 µL de Na₂CO₃ (1M). Posteriormente, se midió la absorbancia de la reacción a 420 y 550 nm para determinar la concentración de *O*-nitrofenol y la turbidez celular, respectivamente. Por último, se calculó la actividad de β-galactosidasa utilizando la ecuación de Miller:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{1000[A_{420} - 1.75(A_{520})]}{(t)(v)(DO_{600})}$$

donde t es el tiempo de reacción en minutos, v es el volumen de la suspensión celular en mL, A_{420} y A_{550} es la absorbancia de la reacción a 420 y 550 nm y DO_{600} es la densidad óptica del cultivo a 600 nm .

5. Medición de los niveles de PCA

5.1. Purificación de PCA

Se crecieron 2 L de cultivo de ID4365 en medio PPGAS (30°C a 200 rpm). Después de 72 horas, se centrifugó (7500 rpm por 10 min) y se recuperó el sobrenadante. Éste se dejó pasar por una columna de resina de Amberlita XAD-4 previamente tratada con una solución de nitrato de sodio (0.2%). La columna cargada se lavó con agua destilada y las fenazinas adsorbidas se eluyeron con metanol. La fase eluida se acidificó con 0.3 volúmenes de HCl 0.2 N y se extrajo con 1 volumen de cloroformo. El extracto se concentró utilizando un rotaevaporador. Tras eliminar totalmente el solvente, se obtuvo el peso del producto seco y se montó una columna de gel de sílice equilibrada con benceno. La cantidad de gel empleada en la columna fue 30 veces el peso del producto seco. La elución se realizó con benceno:ácido acético (19:1) y se recuperaron fracciones de 25 mL. Posteriormente, las fracciones obtenidas se corrieron en cromatografías en placa fina (fase móvil: diclorometano) y se recuperaron aquellas en las que se comprobó la presencia de PCA. Éstas se juntaron y concentraron con ayuda de un rotaevaporador. Tras eliminar el solvente, el producto seco cristalizó a temperatura ambiente. Finalmente, los cristales fueron lavados con cloroformo frío dos veces.

La extracción del PCA se realizó en el laboratorio del Dr. Manuel Jiménez Estrada (Instituto de Química, UNAM) con ayuda del P. de Q.F.B. Rafael Álvarez Chimal.

5.2. Caracterización de PCA

Con el fin de obtener el punto de fusión, se calentó un cristal de PCA purificado en un aparato de Fisher-Johns. Se registraron dos temperaturas: aquellas en las que el compuesto comenzó y terminó de fundirse. Por otra parte, se realizó un espectro UV y una cromatografía en placa fina (fase móvil: diclorometano) del PCA disuelto en cloroformo. Finalmente, se realizó una resonancia magnética, una espectrofotometría de masas y una espectroscopía IR del PCA purificado. Estas tres últimas metodologías se realizaron, respectivamente, en el Laboratorio de Espectroscopía por Resonancia Magnética Nuclear, el Laboratorio de Espectrometría de Masas y el Laboratorio de Espectroscopía y Parametría; todos ellos del Instituto de Química (UNAM).

5.3. Extracción de PCA

Se crecieron cultivos de PAO1 e ID4365 en medio PPGAS a 30°C y 37°C. Después de 72 horas, se centrifugaron (7000 rpm por 10 minutos) y se descartaron los paquetes celulares. Posteriormente, 5 mL de cada sobrenadante se acidificaron con 1.5 mL de HCl 0.2N y se extrajeron con 5 mL de cloroformo. Tras recuperar la fase orgánica, se evaporó el cloroformo en campana y el residuo resultante se resuspendió en 200 µL de cloroformo.

5.4. Comparación relativa de los niveles de PCA

Los extractos obtenidos se corrieron en una cromatografía en capa fina. Como fase estacionaria, se utilizó una placa de gel de sílice 60F254; como fase móvil, se empleó diclorometano puro. Se cargaron 6 µL de cada una de las muestras extraídas, así como de PCA puro disuelto en cloroformo. Para visualizar el PCA, se observó la placa cromatográfica bajo una lámpara de luz UV. Posteriormente, para comprobar la naturaleza alcaloide del compuesto, se reveló con reactivo de Dragendorff.

6. Medición de los niveles de C₄-HS

6.1. Extracción de C₄-HS

Se crecieron cultivos de PAO1 e ID4365 en medio PPGAS a 30°C y 37°C. Doce horas después de que los cultivos alcanzaron una densidad óptica de 1.0, se centrifugaron (7000 rpm por 10 minutos) y se descartaron los paquetes celulares. Posteriormente, 5 mL de cada sobrenadante se extrajeron 2 veces con 5 mL de acetato de etilo acidificado (ácido acético 0.01%). Tras centrifugar (3500 rpm por 5 minutos) y recuperar la fase orgánica, se evaporó el acetato de etilo en campana y el residuo resultante se resuspendió en 200 µL de acetato de etilo.

6.2. Comparación de los niveles relativos de C₄-HS

Los extractos obtenidos se corrieron en una cromatografía en capa fina. Como fase estacionaria, se utilizó una placa de gel de sílice RP18 y, como fase móvil se empleó metanol 60%. Se cargaron 6 µL de cada una de las muestras extraídas, así como de C₄-HSL puro como control. Para revelar el compuesto, se mezclaron 50 mL de un cultivo de *Chromobacterium violaceum* 026 con 50 mL de medio LB y se vertió la cantidad necesaria para cubrir la placa cromatográfica. Posteriormente, la placa se incubó a 30°C durante 24 horas. El cultivo de *C. violaceum* 026 utilizado se creció 12 horas antes en medio YT2 con kanamicina (100µg/mL).

Resultados y Discusión

1. Crecimiento y producción de pirocianina

Con el fin de comparar el crecimiento y la producción de pirocianina entre PAO1 e ID4365, se crecieron cultivos a 30°C y 37°C durante 24 horas. Como se puede observar en la Fig. 7, el patrón de crecimiento fue muy similar entre estas cepas: las dos comenzaron la fase estacionaria alrededor de una densidad óptica de 1.0 y ambas crecieron más rápidamente a 37°C. Además, las densidades ópticas máximas registradas en la fase estacionaria fueron prácticamente idénticas entre las dos temperaturas.

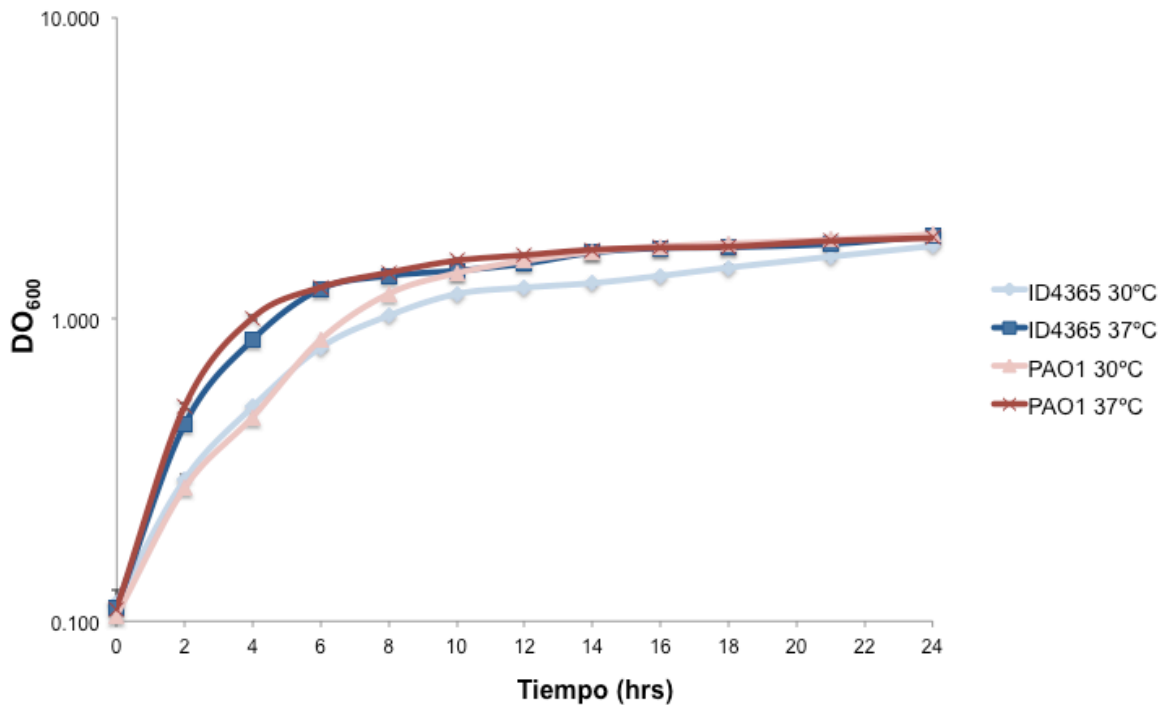


Figura 7. Curvas de crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 e ID4365 a 30°C y 37°C durante 24 horas. Para obtener los niveles de crecimiento, se midió la densidad óptica a 600 nm de los cultivos.

En contraste, se observaron diferencias significativas en la producción de pirocianina. (Fig 8). En primer lugar, la cepa ID4365 presentó los niveles más altos de producción de este compuesto. En relación a los valores alcanzados por PAO1, los niveles alcanzados por ID4365 fueron casi 100 veces mayores cuando los

cultivos se incubaron a 30°C; y 12 veces mayores cuando se incubaron a 37°C. A su vez, la temperatura afectó la producción de piocianina en cada una de las cepas, aunque de manera opuesta: mientras que, en PAO1, los niveles máximos se registraron a 37°C; en ID4365, se observaron a 30°C.

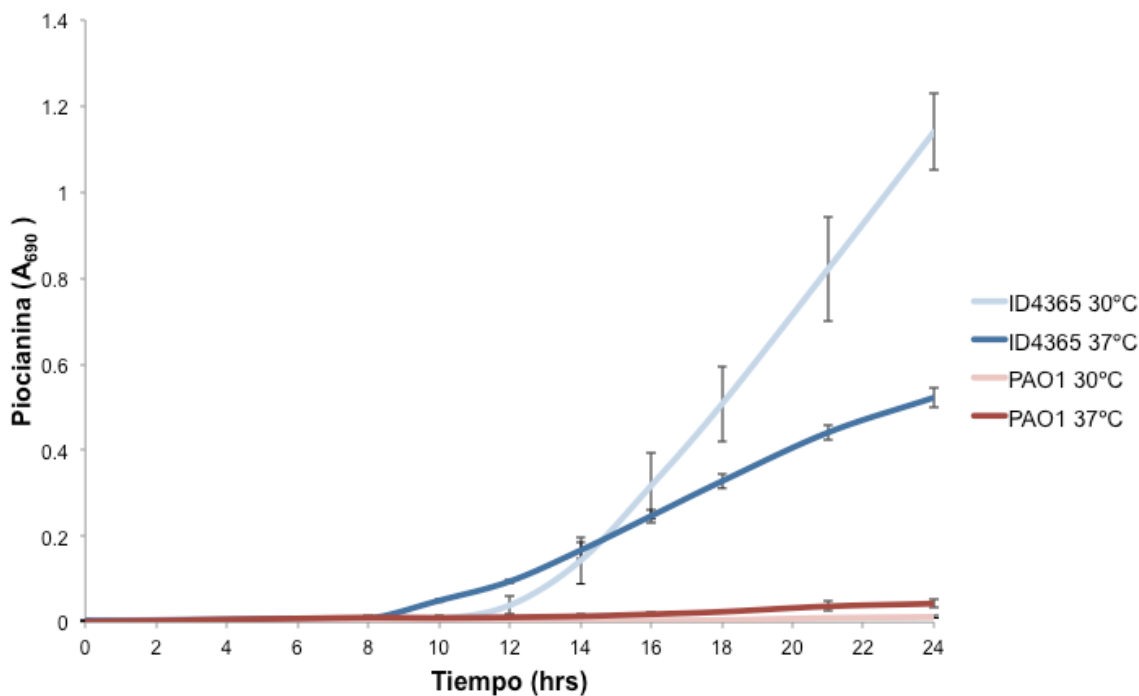


Figura 8. Producción de piocianina en *P. aeruginosa* PAO1 e ID4365 a 30 y 37°C durante 24 horas. Para obtener los niveles de piocianina, se midió la absorbancia a 690 nm de los sobrenadantes. Las barras de error representan la desviación estándar de la media obtenida de la medición de tres réplicas independientes.

Cabe destacar que la producción de piocianina comenzó a detectarse después de diez horas, cuando la fase estacionaria ya estaba bien establecida. Esto tiene sentido considerando que la producción de esta fenazina es regulada por “quorum sensing”. Así, a bajas densidades ópticas, la concentración celular no es suficiente para activar la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de este compuesto.

2. Estado de los operones *phz* en *Pseudomonas aeruginosa* ID4365

La primera fase de la biosíntesis de piocianina consiste en la conversión de ácido corísmico a ácido fenazin-1-carboxílico (PCA) por las enzimas codificadas en el operón *phzABCDEFGG*. Como se mencionó antes, dicho operón se encuentra duplicado en *P. aeruginosa*. Por ello, se verificó la presencia de ambas copias en la cepa ID4365. Para esto, se realizaron búsquedas mediante BLAST de cada uno de los genes de PAO1 contra las secuencias de los contigs en los que se encuentra ensamblado preliminarmente el genoma de ID4365. Los resultados revelaron la presencia de una sola copia de todos los genes. Los cinco primeros (*phzA – phzE*) fueron ubicados en el contig “NODE_5”, mientras que *phzF* y *phzG* fueron ubicados en el contig “NODE_344” (Fig. 9).

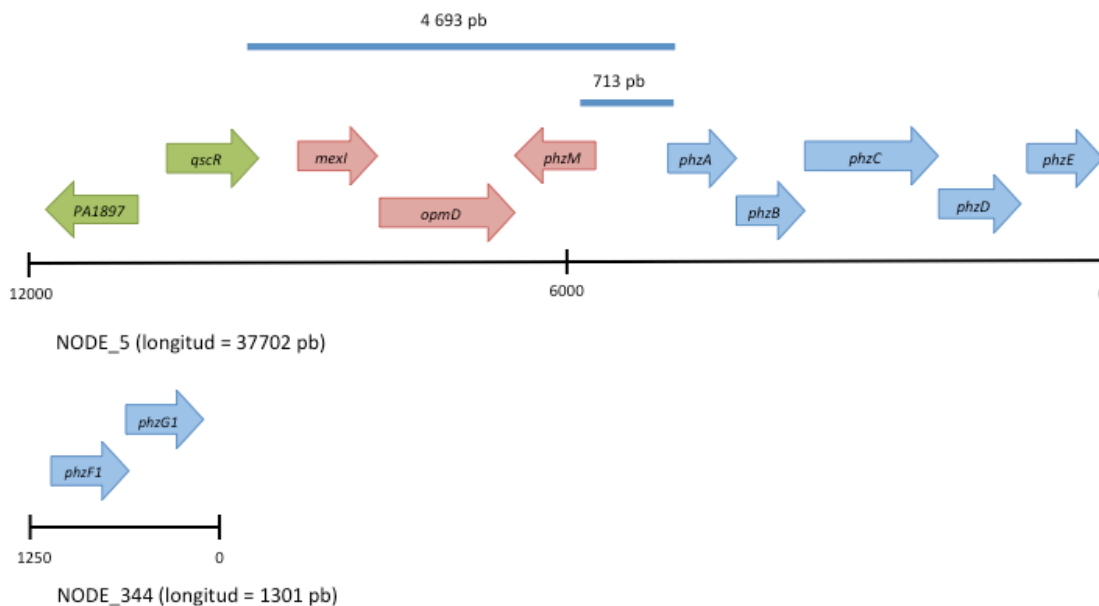


Figura 9. Disposición de los genes *phz* en el armazo preliminar de la secuencia del genoma de la cepa ID4365. En azul, se muestran los genes correspondientes al operón *phz*; en rojo, los genes contiguos al operón *phzA1B1C1D1E1F1G1* en PAO1; en verde, los genes contiguos al operón *phzA2B2C2D2E2F2G2* en PAO1. Se muestra también el tamaño de los productos esperados tras una amplificación por PCR con los oligos “*phzA_FWD*”, “*phzM_RWD*” y “*qscR_RWD*”. La orientación original de las secuencias de los contigs se invirtió para facilitar las comparaciones con el genoma de PAO1.

A pesar de que estos datos indicaron la existencia de un operón único, una revisión más detallada del contig “NODE_5” mostró que, además de los genes *phz*, éste presenta genes que se encuentran contiguos a *phzA1B1C1D1E1F1G1* y a *phzA2B2C2D2E2F2G2* en otras cepas secuenciadas (Fig. 10). De esta forma, *phzM*, *opmD* y un fragmento de *mexI* (genes que, en PAO1, se localizan junto a *phzA1*) son aparentemente seguidos por *qscR*, PA1897 y PA1896 (genes que, en PAO1, se localizan junto a *phzA2*). Dicha configuración sugirió la presencia de un error en el armado del genoma, una situación bastante probable considerando que los programas de ensamblaje suelen colapsar secuencias duplicadas en una sola copia (Zimin *et al.* 2012).

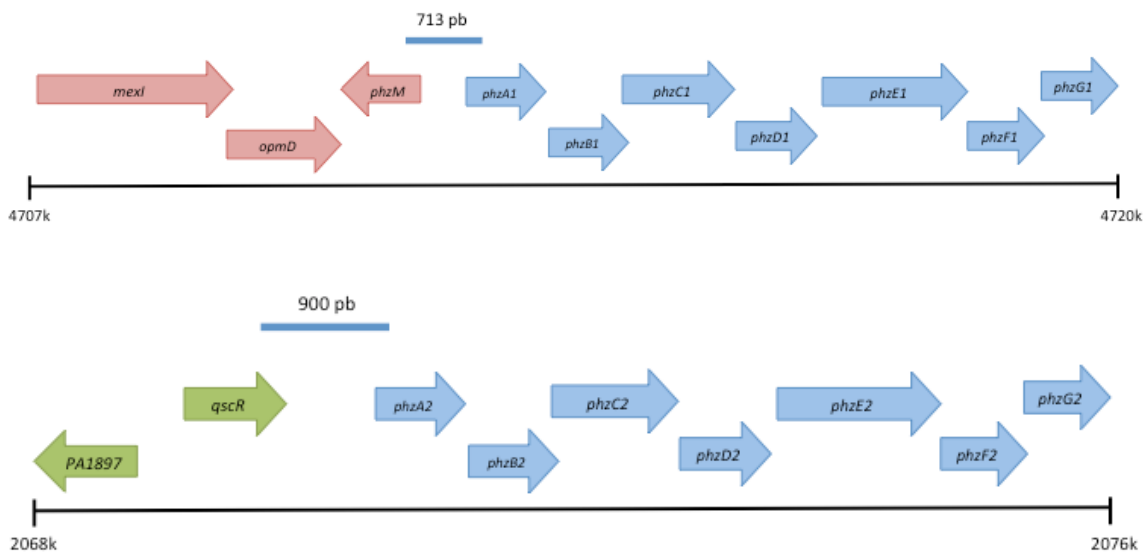


Figura 10. Disposición de los genes *phz* en el genoma de la cepa PAO1. En azul, se muestran los genes correspondientes al operón *phz*; en rojo, los genes contiguos al operón *phzA1B1C1D1E1F1G1*; en verde, los genes contiguos al operón *phzA2B2C2D2E2F2G2*. Se muestra también el tamaño de los productos esperados tras una amplificación por PCR con los oligos “*phzA_FWD*”, “*phzM_RWD*” y “*qscR_RWD*”.

Como consecuencia, surgieron dos posibilidades: (1) que la cepa ID4365 contase sólo con un operón o (2) que el ensamblaje del genoma hubiese presentado errores y la cepa tuviese ambos. Con el fin de abordar este problema, se diseñaron oligonucleótidos para hacer reacciones de PCR que permitieran definir cuál era el escenario correcto. Los oligonucleótidos utilizados fueron “*phzA_FWD*”, “*phzM_RWD*” y “*qscR_RWD*”. Cada uno hibridiza con el gen que

lleva su nombre. De esta forma, tras amplificar, se esperarían fragmentos con diferentes tamaños dependiendo de la disposición de los genes. Si éstos se presentaran como lo indica el armado preliminar del genoma, los tamaños serían de 900 pb y 4693 pb. En contraste, si los genes estuvieran dispuestos de manera similar a los genes en PAO1, los tamaños serían de 900 pb y 713 pb. Los resultados de las reacciones de PCR apoyaron el segundo caso (Fig. 11).

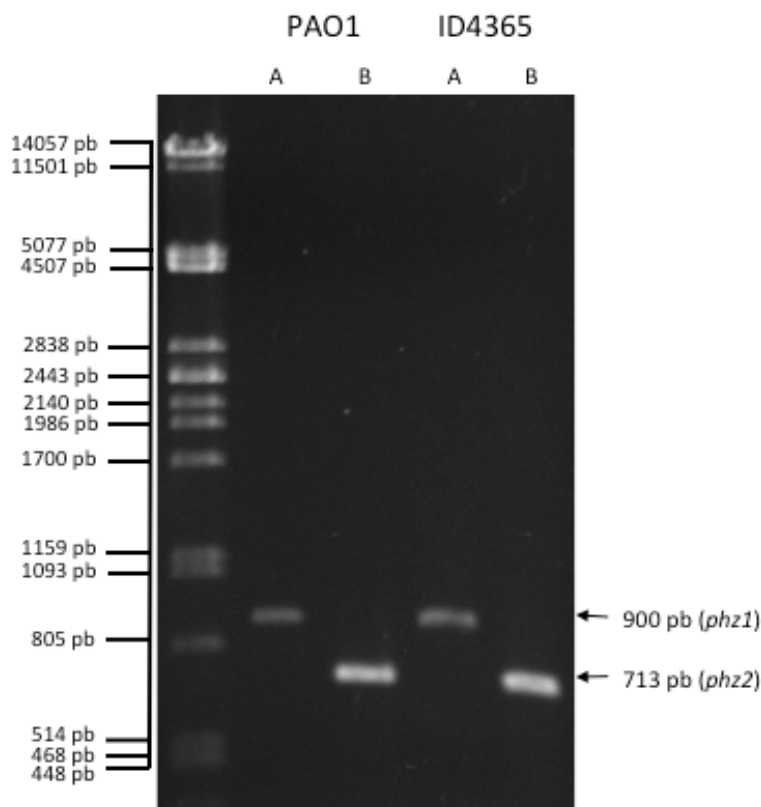


Figura 11. Gel de electroforesis de los fragmentos amplificados mediante PCR. La letra A indica que el fragmento amplificado se obtuvo empleando los oligos “phzA_FWD” y “phzM_RWD”; la letra B indica que se emplearon los oligos “phzA_FWD” y “qscR_RWD”.

Adicionalmente, los fragmentos obtenidos tras la amplificación fueron secuenciados. El producto proveniente de la amplificación con “phzA_FWD” y “phzM_RWD” con el DNA de ID4365 presentó una secuencia 99% idéntica a la región entre *phzM* y *phzA1* de PAO1, con sólo 3 polimorfismos detectados (Fig. 12). Dichos polimorfismos se ubican en la región intergénica y ninguno de ellos modifica la caja *las*.

1	TTATT CAT CTTTTATTCTCTCTCGTTACACATTTCCGTAACCCGAGAAGTACCCAAGCGC	ID4365
1	TTATT CAT CTTTTATTCTCTCTCGTTACACATTTCCGTAACCCGAGAAGTACCCAAGCGC	PA01
61	TCTATTTGCACTTCTTGCCCGCTCGGCGAGAAATACCGCAGAACACCCCGTTTCATTG	ID4365
61	TCTATTTGCACTTCTTGCCCGCTCGGCGAGAAATACCGCAGAACACCCCGTTTCATTG	PA01
121	GAACTTTGAGAAAAAT G CGCTCATCCCCGGATCAGCGCTCCCTGGATCTCGTTGCGGA	ID4365
121	GAACTTTGAGAAAAAT A CGCTCATCCCCGGATCAGCGCTCCCTGGATCTCGTTGCGGA	PA01
181	AACAACCCTGGAACTTTCCAACCTGCCTGTTCCAGAGCCTTTTCTGCGTACCGAAAGAAT	ID4365
181	AACAACCCTGGAACTTTCCAACCTGCCTGTTCCAGAGCCTTTTCTGCGTACCGAAAGAAT	PA01
241	AAAATTACAACCTTGCTACAACCTCCGGCATTGCAGGAAGCATCAGCTTAGCAATCCCGC	ID4365
241	AAAATTACAACCTTGCTACAACCTCCGGCATTGCAGGAAGCATCAGCTTAGCAATCCCGC	PA01
301	ATACCCTGTCTGGC ACCTACCAGATCTTGTAGTT GAGCCGGTACGAGCGTTCTGTGTTTT	ID4365
301	ATACCCTGTCTGGC ACCTACCAGATCTTGTAGTT GAGCCGGTACGAGCGTTCTGTGTTTT	PA01
361	ATGCAATCCACATCAGCGACCAGGGATGCTGGCTATTTGAAACACTTCACGGAATGACGC	ID4365
361	ATGCAATCCACATCAGCGACCAGGGATGCTGGCTATTTGAAACACTTCACGGAATGACGC	PA01
421	TGAAAGTCTTCGCGACCTCGTCTGTCGCACCTTAACGAAAGCATTGCGAATCCATTACCG	ID4365
421	TGAAAGTCTTCGCGACCTCGTCTGTCGCACCTTAACGAAAGCATTGCGAATCCATTACCG	PA01
481	ACAGGTTT T CAAAAGAAACCCGGATGAAACTCCTATTGCCTTTCGAAAATTGGAAACGA	ID4365
481	ACAGGTTT C CAAAAGAAACCCGGATGAAACTCCTATTGCCTTTCGAAAATTGGAAACGA	PA01
541	CAGGCGAACATATGTAACGCGAAATTTAC T CTACGTATAAACAATGCGCCAGCGAATA	ID4365
541	CAGGCGAACATATGTAACGCGAAATTTAC C CTACGTATAAACAATGCGCCAGCGAATA	PA01
601	TCGCTCCCTTACCGAGCGACGAACTCCTGCGCGCCAGCGAATAACCGATGCCGCGAGGGA	ID4365
601	TCGCTCCCTTACCGAGCGACGAACTCCTGCGCGCCAGCGAATAACCGATGCCGCGAGGGA	PA01
661	AAAGTTTCTCCGGCATACTGGAGAGCCCTCTCGGAGGCGGCGC ATG AACGGTCAGCGGT	ID4365
661	AAAGTTTCTCCGGCATACTGGAGAGCCCTCTCGGAGGCGGCGC ATG AACGGTCAGCGGT	PA01
721	ACAGGGAAACACCCCTCGACATCGAGCGTCTGCGGCGCCTGAATCGCGCCACGGTGGAGC	ID4365
721	ACAGGGAAACACCCCTCGACATCGAGCGTCTGCGGCGCCTGAATCGCGCCACGGTGGAGC	PA01
781	GCTACATGGC C ATGAAGGGGGCCGAACGGTT G CAGCGGCACAGCCTG	ID4365
781	GCTACATGGC A ATGAAGGGGGCCGAACGGTT A CAGCGGCACAGCCTG	PA01

Figura 12. Alineamiento entre las secuencias río arriba del operón *phz1* provenientes de ID4365 (línea superior) y PA01 (línea inferior). En amarillo, se encuentra marcada la caja *las*; en verde, el codón de inicio de *phzM*; en azul, el codón de inicio de *phzA1*; en rosa, los polimorfismos detectados. En PA01, la secuencia mostrada corresponde a los nucleótidos 4713092 – 4713918 del genoma de esta cepa.

Por su parte, el producto proveniente de la amplificación con “*phzA_FWD*” y “*qscR_RWD*” con el DNA de ID4365 tiene una secuencia 98% idéntica a la región entre *qscR* y *phzA2* de PAO1. En este caso, se registraron 11 polimorfismos: 2 en la región codificante de *qscR*, 3 en la región codificante de *phzA2* y 6 en la región intergénica (Fig. 13)

1	AACAA T GCGGAGGCCACCATGAAGGC C TACGCCATCGGCCTGCTCAAC TGA ATCGACGCC	ID436
1	AACAA G GCGGAGGCCACCATGAAGGC T TACGCCATCGGCCTGCTCAAC TGA ATCGACGCC	PAO1
61	TCGTCGCCTAGCGAGGCCGCC A CGCAAGCGTCCGGCCATTACACGAATGGCCGGATAGCG	ID4365
61	TCGTCGCCTAGCGAGGCCGCC G CGCAAGCGTCCGGCCATTACACGAATGGCCGGATAGCG	PAO1
121	TTTGCGCCGGT T GCCTGAGCGCAGCCTTCCACCGGCAGCGTTTCCCGCTG G CCCCTTC	ID4365
121	TTTGCGCCGGT C GCCTGAGCGCAGCCTTCCACCGGCAGCGTTTCCCGCTG C CCCCTTC	PAO1
180	GCCATTGCGCCCGTCTCTCTGTTGTCCGGCACGCTAGTGCAACTTTCCGG A CG C TGGCA	ID4365
181	GCCATTGCGCCCGTCTCTCTGTTGTCCGGCACGCTAGTGCAACTTTCCGG G CG C TGGCA	PAO1
240	AACCGGCCAAAGAATAGAACGGAATCGATGCCCCACACCTGTAATTTTTAAGGGGTTATG	ID4365
241	AACCGGCCAAAGAATAGAACGGAATCGATGCCCCACACCTGTAATTTTTAAGGGGTTATG	PAO1
300	GCTATTGCAAAAAAGCGTTTATAAGTTTGTCCCTGTCAAATCTGGTTACAACCTGGGTTT	ID4365
301	GCTATTGCAAAAAAGCGTTTATAAGTTTGTCCCTGTCAAATCTGGTTACAACCTGGGTTT	PAO1
360	CAGGCGAAACATTCGGTCATGGCAATTCGGCATTAGTTGAAACTTTGGAGACGCTCCGAA	ID4365
361	CAGGCGAAACATTCGGTCATGGCAATTCGGCATTAGTTGAAACTTTGGAGACGCTCCGAA	PAO1
420	GCGGGCAACTTTTGCCTGGAAAAAG T TCACGGCAATTTCTCCGGCCTGTCATCCCGATG	ID4365
421	GCGGGCAACTTTTGCCTGGAAAAAG C TCACGGCAATTTCTCCGGCCTGTCATCCCGATG	PAO1
480	TCTTCTTTCCGGTATGGATGCCAGTCGATTGCAACTGGCGGAGATTCGCACC ATG CGAGA	ID4365
481	TCTTCTTTCCGGTATGGATGCCAGTCGATTGCAACTGGCGGAGATTCGCACC ATG CGAGA	PAO1
540	GTACCAACGGTTGAAAGGGTTTACCGACAACCTGGAATT A CG G CGGCGCAACCGTGCCAC	ID4365
541	GTACCAACGGTTGAAAGGGTTTACCGACAACCTGGAATT G CG T CGGCGCAACCGTGCCAC	PAO1
600	GGTCGAGCACTACATGCGCATGAAGGGGGCCGAACGGTT G CAGCGGCACAGCCTGTTTCGT	ID4365
601	GGTCGAGCACTACATGCGCATGAAGGGGGCCGAACGGTT A CAGCGGCACAGCCTGTTTCGT	PAO1
660	CGAGGACGGCTGCGCC	ID4365
661	CGAGGACGGCTGCGCC	PAO1

Figura 13. Alineamiento entre las secuencias río arriba del operón *phz2* provenientes de ID4365 (línea superior) y PAO1 (línea inferior). En morado, se encuentra marcado el codón de término de *qscR*; en azul, el codón de inicio de *phzA2*; en rosa, los polimorfismos detectados. En PAO1, la secuencia mostrada corresponde a los nucleótidos 2070153 – 2070828 del genoma de esta cepa.

3. Actividad transcripcional de los operones *phzABCDEFGF*

Con el fin de comparar los niveles de expresión del operón *phzA1B1C1D1E1F1G1* entre ID4365 y PAO1, se transformaron estas cepas con el plásmido pMP_*phzA1*. Dicho plásmido, construido en el laboratorio de la Dra. Gloria Soberón, contiene una fusión transcripcional del promotor de *phzA1B1C1D1E1F1G1* proveniente de PAO1 con el gen *lacZ* (Fig. 14). Como se señaló previamente, aunque los promotores de ambas cepas presentan algunas diferencias entre sí, éstas son mínimas y no afectan la caja *las*. Por esta razón, se consideró innecesario construir una fusión con la secuencia de ID4365.

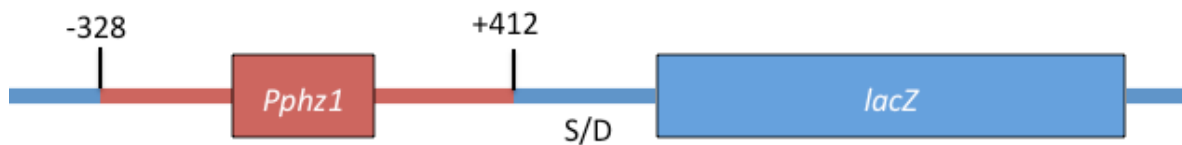
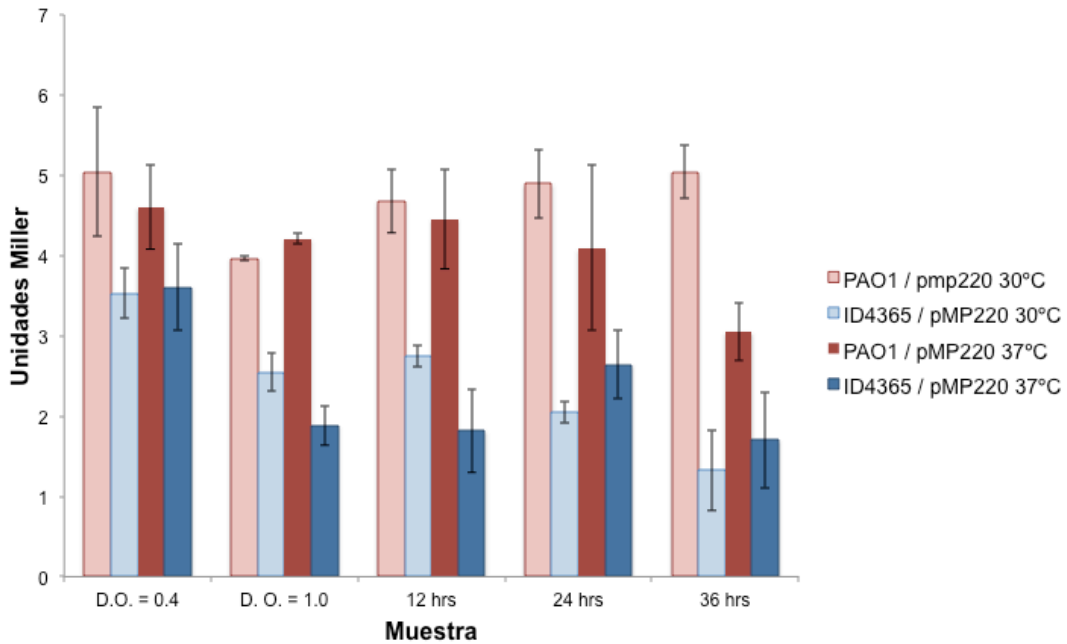
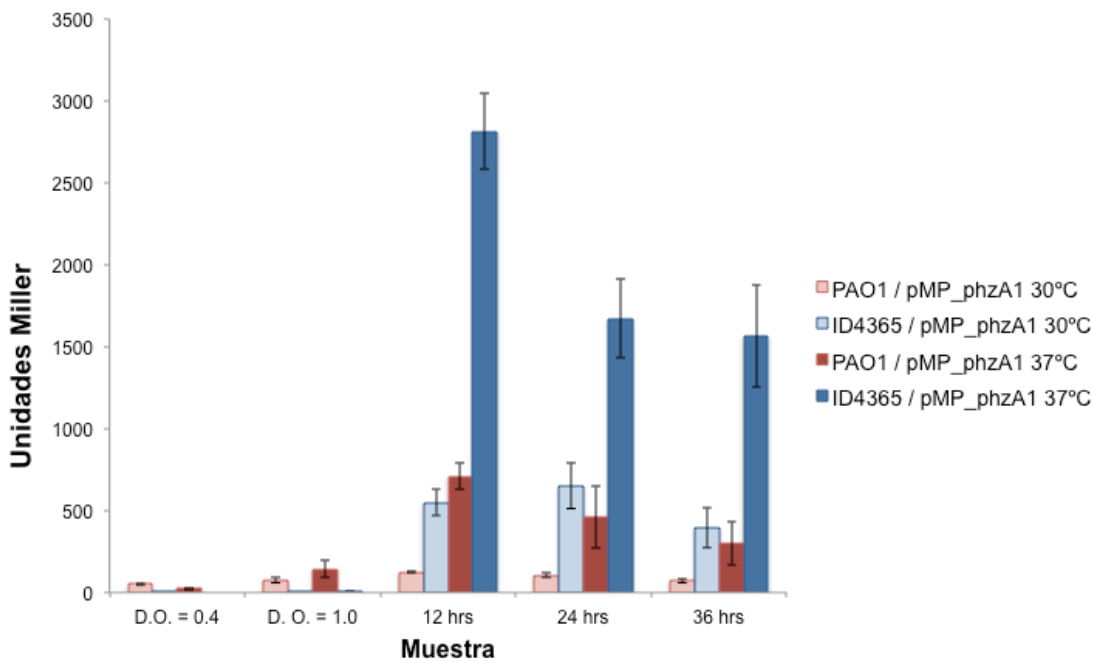


Figura 14. Mapa físico de la fusión transcripcional contenida en pMP_*phzA1*. La numeración es relativa al sitio de inicio de la transcripción de *phzA1* definido en Li *et al.* (2011); S/D es la secuencia Shine/Dalgarno del vector pMP220

Tomando en cuenta que el operón *phzA1B1C1D1E1F1G1* es regulado por el sistema de “quorum sensing” RhIR/RhII, se optó por medir la actividad de la fusión transcripcional a diferentes densidades celulares. Para ello, se eligieron cinco puntos que abarcasen diferentes fases en la curva de crecimiento. Los dos primeros, tomados cuando el cultivo alcanzó densidades ópticas de 0.4 y 1.0, corresponden respectivamente a la fase exponencial temprana y tardía. Los otros, tomados a 12, 24 y 36 horas después de haber alcanzado la densidad óptica de 1.0, corresponden a diferentes momentos de la fase estacionaria. En cada uno de estos puntos, se midió la actividad de β -galactosidasa. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado a 30°C y 37°C. Adicionalmente, para medir los niveles basales de expresión, se realizó un ensayo empleando las dos cepas transformadas con el plásmido pMP220 sin inserto.



A



B

Figura 15. Actividad de β -galactosidasa (A) del plásmido pMP220 y (B) del plásmido pMP_phzA1 en las cepas PAO1 e ID4365 a 30°C y 37°C. Las barras de error representan la desviación estándar de la media obtenida de la medición de tres réplicas independientes.

Los datos obtenidos (Fig. 15) mostraron que, en ambas cepas, la actividad de β -galactosidasa no supera los niveles basales durante la fase exponencial. Dicho resultado sugiere que la densidad celular en los dos primeros puntos no es suficiente para que el sistema RhIR/RhII active la transcripción del operón *phzA1B1C1D1E1F1G1*. En contraste, a partir del inicio de la fase estacionaria, se registró un aumento considerable en los niveles transcripcionales de las dos cepas. Estos niveles se mantuvieron relativamente estables en todos los casos, con excepción de la cepa ID4365 crecida a 37°C, la cual presentó una disminución de la actividad transcripcional en la fase estacionaria tardía.

Al analizar los datos correspondientes a la fase estacionaria, es evidente que existen diferencias significativas entre los niveles de β -galactosidasa de PAO1 e ID4365, presentando esta última una actividad transcripcional superior. En el punto de mayor expresión (12 horas después de haber alcanzado la densidad óptica de 1.0), los valores alcanzados por esta cepa llegan a ser 4 veces los observados en PAO1. Dicha tendencia se registró a 30°C y 37°C. A su vez, la temperatura de crecimiento demostró tener un efecto directo sobre la actividad transcripcional de ambas cepas. En relación con los niveles detectados a 30°C, PAO1 quintuplicó la producción de β -galactosidasa a 37°C, mientras que ID4365 la cuadruplicó. De esta forma, la cepa con mayor actividad transcripcional fue ID4365 crecida a 37°C.

Lo anterior contrasta con el patrón de síntesis de piocianina ya que, si bien ID4365 presenta una sobreexpresión respecto a PAO1, la producción de este compuesto es mayor a 30°C. Para evaluar si la expresión del operón *phzA2B2C2E2F2G2* pudiese explicar esto, se construyeron los plásmidos pMP1CS y pmP2CS. En ellos, el promotor de *phzA2B2C2D2E2F2G2* proveniente de PAO1 e ID4365, respectivamente, se fusionó transcripcionalmente con el gen *lacZ* (Fig. 16). Cada uno de los plásmidos se introdujo por transformación en las dos cepas. Los ensayos de expresión se realizaron siguiendo los mismos parámetros descritos anteriormente.

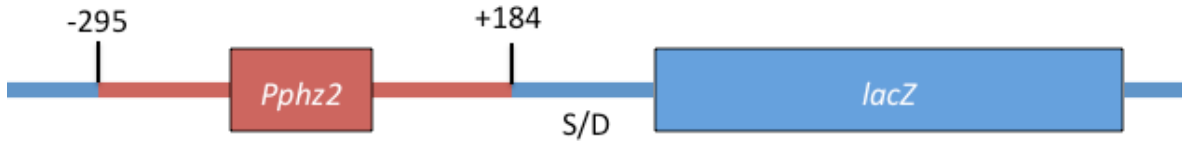


Figura 16. Mapa físico de la fusión transcripcional contenida en pMP1CS y pMP2CS. La numeración es relativa al sitio de inicio de la transcripción de *phzA2* definido en Li *et al.* (2011); S/D es la secuencia Shine / Dalgarno del vector pMP220. En el caso de pMP1CS, la secuencia clonada proviene de PAO1; en pMP2CS, proviene de ID4365.

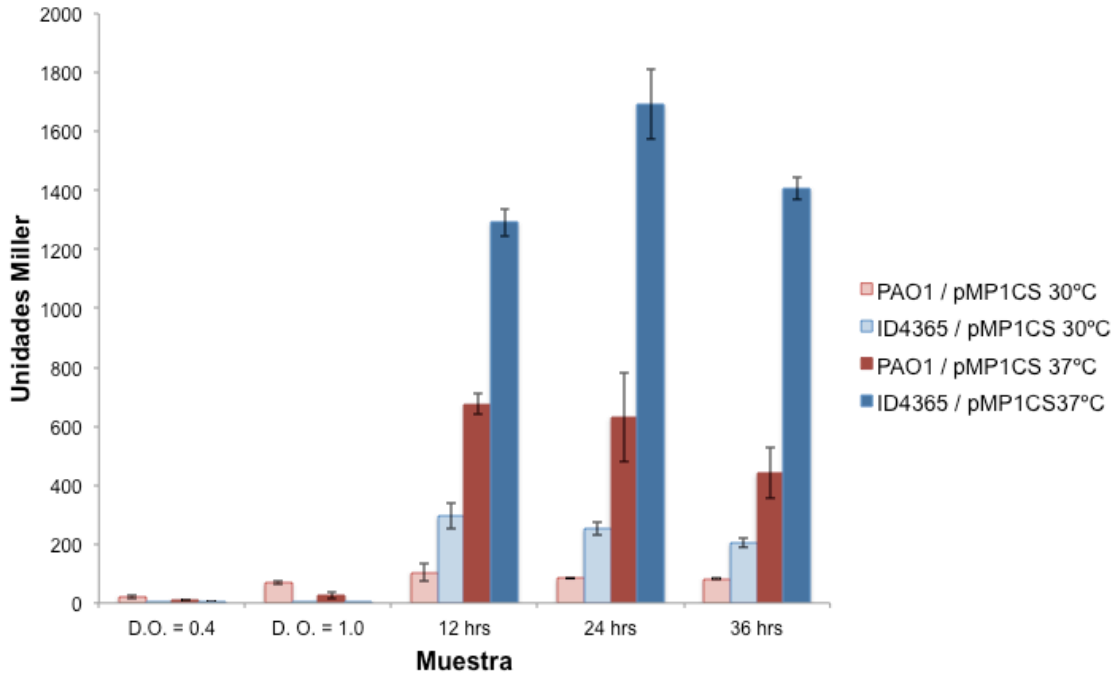


Figura 17. Actividad de β-galactosidasa de la fusión transcripcional pMP1CS en las cepas PAO1 e ID4365 a 30°C y 37°C. Las barras de error representan la desviación estándar de la media obtenida de la medición de tres réplicas independientes.

En la Fig. 17, se muestran los niveles de β-galactosidasa producidos por las cepas transformadas con el plásmido pMP1CS. Como se puede apreciar, el patrón transcripcional es muy parecido al del operón *phzA1B1C1D1E1F1G1*: ID4365 presenta niveles de β-galactosidasa mayores que los de la PAO1 y ambas cepas aumentan su actividad transcripcional a 37°C. No obstante, en relación a los valores absolutos obtenidos con el plásmido pMP_{phzA1}, los niveles de expresión de la fusión pMP1CS son menores, especialmente en la cepa ID4365. En el primer caso, el valor máximo llegó aproximadamente a 3000 U. M.; mientras que, en el segundo, no rebasó las 2000 U. M.

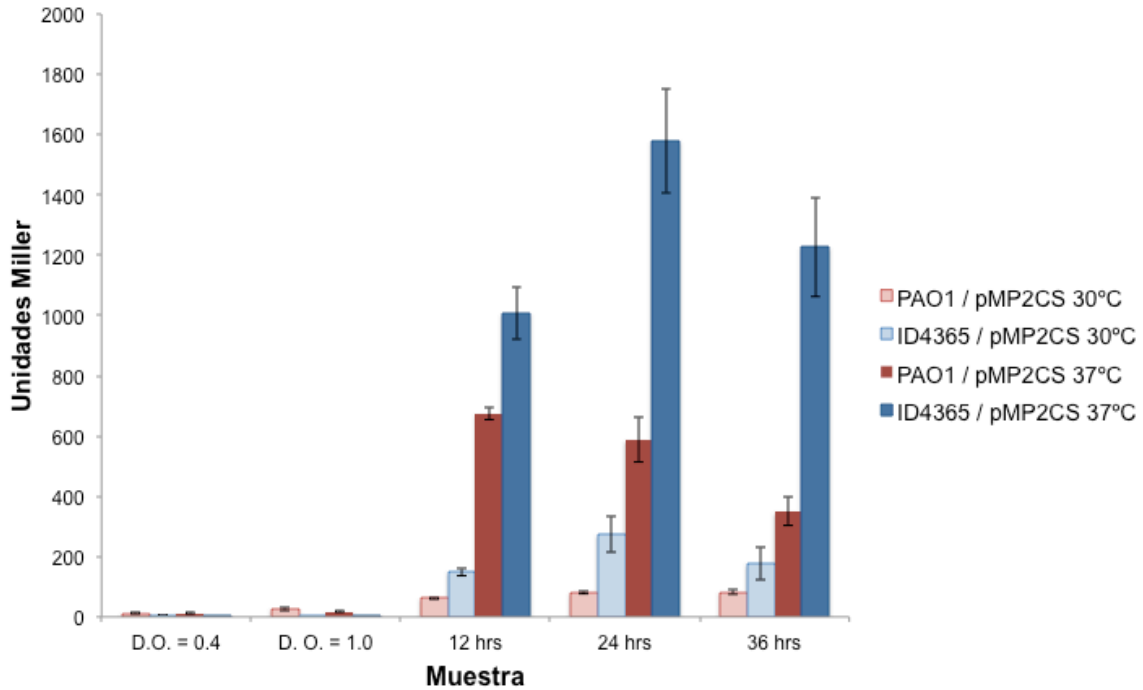


Figura 18. Actividad de β-galactosidasa del plásmido pMP2CS en las cepas PAO1 e ID4365 a 30°C y 37°C. Las barras de error representan la desviación estándar de la media obtenida de la medición de tres réplicas independientes.

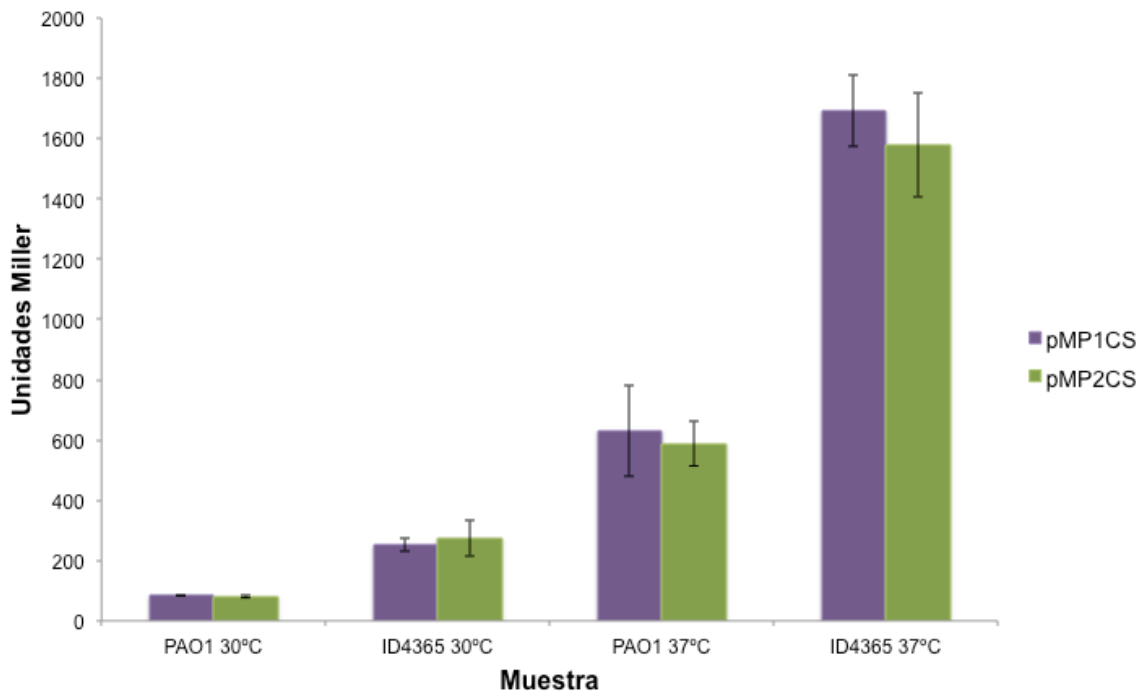


Figura 19. Comparación entre los niveles de β-galactosidasa de los plásmidos pMP1CS y pMP2CS. Los datos se tomaron 24 horas después de que los cultivos de PAO1 e ID4365 alcanzaran una densidad óptica de 1.0. Las barras de error representan la desviación estándar de la media obtenida de la medición de tres réplicas independientes.

Por otra parte, los niveles detectados con el plásmido pMP2CS son prácticamente idénticos a los registrados con pMP1CS (Fig. 18). De hecho, no se observaron diferencias significativas en los valores registrados en el punto de mayor expresión (Fig. 19). Lo anterior indica que los 6 polimorfismos presentes en la región intergénica de ambas cepas no afectan los niveles transcripcionales del operón.

De esta forma, los análisis transcripcionales de *phzA1B1C1D1E1F1G1* y *phzA2B2C2E2F2G2* mostraron que, respecto a PAO1, ID4365 sobreexpresa ambos operones tanto a 30°C como a 37°C. Además, mientras que los niveles máximos de β-galactosidasa en ID4365 se alcanzaron a 37°C, la producción máxima de piocianina se presentó a 30°C. Como consecuencia, aunque los resultados podrían explicar las diferencias en la producción de piocianina registradas entre ambas cepas, éstos no coinciden con el patrón de regulación por temperatura en ID4365.

Considerando lo anterior, se planteó la posibilidad de que el incremento en la producción de piocianina en la cepa ID4365 a 30°C fuera resultado de una mayor expresión de *phzM* a esta temperatura. La enzima PhzM es la encargada de metilar el PCA y convertirlo en 5-metil-PCA, el precursor directo de la piocianina. De esta forma, una mayor expresión de esta enzima a 30°C implicaría una mayor conversión de PCA a piocianina. Así, a pesar de que a 37°C existe una sobreexpresión de los operones responsables de la síntesis de PCA, los niveles de piocianina a esta temperatura serían menores. Como consecuencia, dado que a 37°C habría un menor flujo metabólico destinado a la síntesis de piocianina, se esperarían que la concentración de PCA fuera mayor. De hecho, algo similar se ha observado en M18, una cepa de *P. aeruginosa* que sobreproduce PCA. Huang *et al.* (2009) han demostrado que dicha sobreproducción es, en parte, resultado de una baja expresión de *phzM*. Con esto en mente, se optó por medir la actividad transcripcional de este gen, así como los niveles de PCA, en cada una de las cepas.

4. Actividad transcripcional de *phzM*

Con el fin de evaluar la actividad transcripcional de *phzM*, se construyeron los plásmidos pMP3CS y pMP4CS. Éstos contienen el promotor de *phzM*, proveniente de PAO1 e ID4365 respectivamente, fusionado con el gen *lacZ* (Fig. 20). Al igual que en el caso anterior, ambos plásmidos se introdujeron por transformación en las dos cepas y se realizaron ensayos de expresión por triplicado.

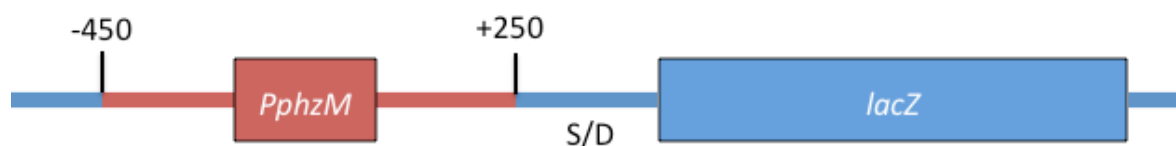


Figura 20. Mapa físico de la fusión transcripcional contenida en pMP3CS y pMP4CS. La numeración es relativa al sitio de inicio de la transcripción de *phzM* definido en Huang *et al.* (2009); S/D es la secuencia Shine / Dalgarno del vector pMP220. En el caso de pMP3CS, la secuencia clonada proviene de PAO1; en pMP4CS, proviene de ID4365.

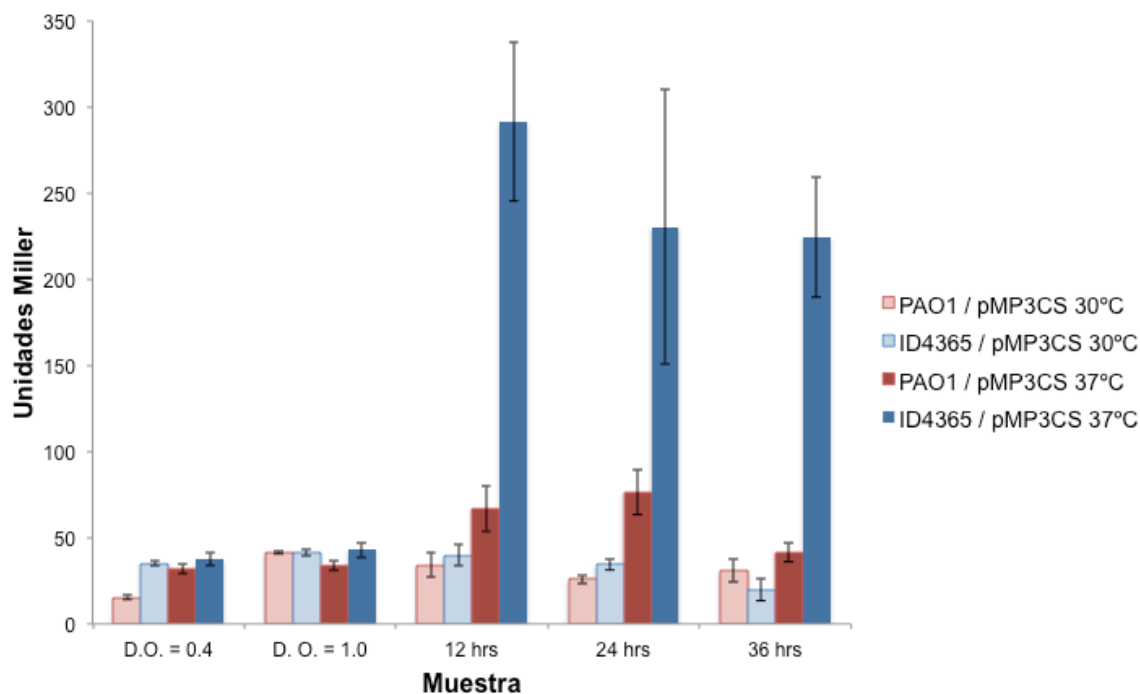


Figura 21. Actividad de β-galactosidasa de la fusión transcripcional pMP3CS en las cepas PAO1 e ID4365 a 30 y 37°C. Las barras de error representan la desviación estándar de la media obtenida de la medición de tres réplicas independientes.

Los datos obtenidos con el plásmido pMP3CS (Fig. 21) mostraron que los niveles transcripcionales de PAO1 e ID4365 son mayores cuando las cepas crecen a 37°C que cuando crecen a 30°C. Sin embargo, mientras que, a 30°C, la actividad de β -galactosidasa de ambas cepas es prácticamente idéntica; a 37°C, ID4365 presenta valores 4 veces mayores a los registrados en PAO1. Así, al igual que con los operones *phzABCDEFG*, la cepa ID4365 crecida a 37°C cuenta con los niveles transcripcionales de *phzM* más altos. De esta forma, los resultados son incompatibles con la hipótesis de que la sobreproducción de pociarina en ID4365 a 30°C es consecuencia de una mayor expresión de *phzM*.

En el caso del plásmido pMP4CS, el patrón es esencialmente el mismo: mayor actividad a 37°C que a 30°C, así como mayor actividad en ID4365 que en PAO1 (Fig. 22). Además, los valores registrados para esta fusión no presentan diferencias significativas con los detectados usando el plásmido pMP3CS (Fig. 23) Esto indica que los polimorfismos en la región intergénica no alteran los niveles transcripcionales de *phzM*.

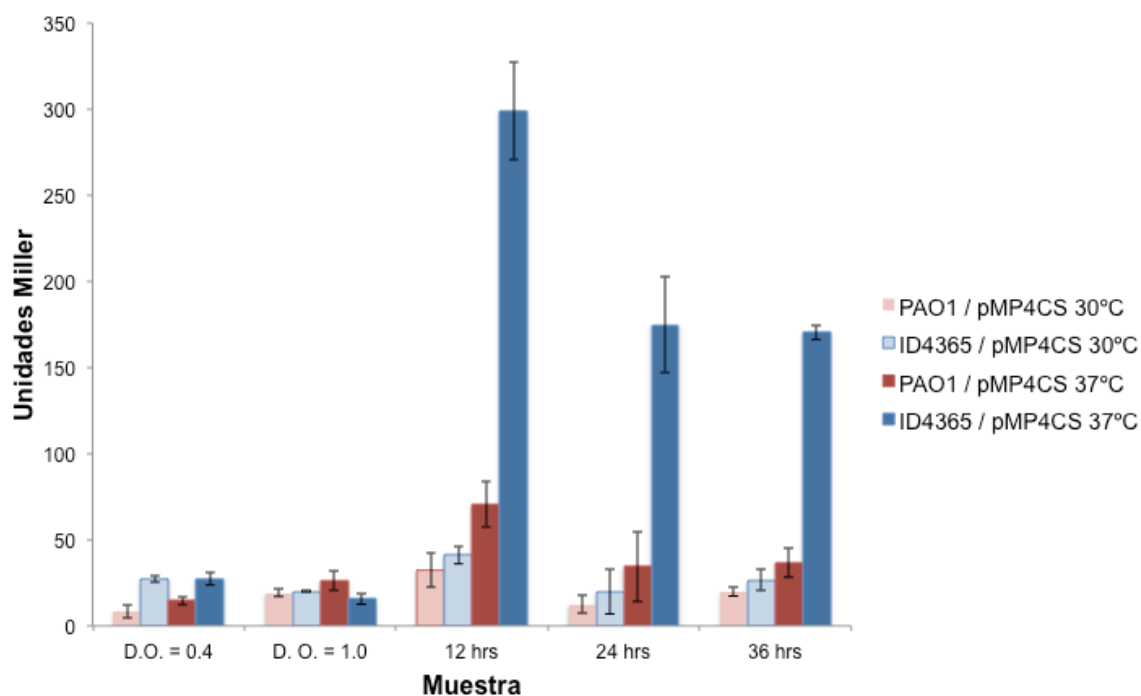


Figura 22. Actividad de β -galactosidasa del plásmido pMP4CS en las cepas PAO1 e ID4365 a 30°C y 37°C. Las barras de error representan la desviación estándar de la media obtenida de la

medición de tres réplicas independientes.

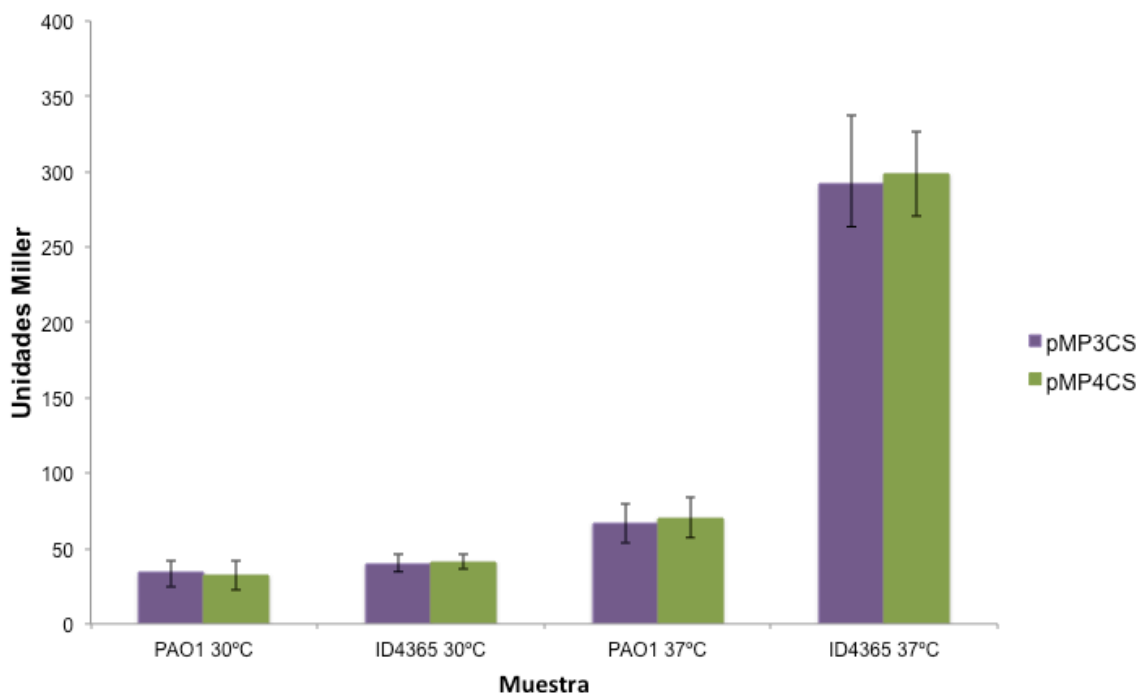


Figura 23. Comparación entre los niveles de β -galactosidasa de los plásmidos pMP3CS y pMP4CS. Los datos se tomaron 12 horas después de que los cultivos de PAO1 e ID4365 alcanzaran una densidad óptica de 1.0. Las barras de error representan la desviación estándar de la media obtenida de la medición de tres réplicas independientes.

Por otra parte, cabe señalar que los valores absolutos de β -galactosidasa registrados para estas dos fusiones transcripcionales son considerablemente menores a los obtenidos con los promotores de los operones *phzABCDEFG*. De hecho, el nivel máximo alcanzado con pMP3CS y pMP4CS es apenas la décima parte del obtenido con el pMP_*phzA1* y la quinta parte del alcanzados por pMP1CS y pMP2CS.

5. Niveles de PCA

Antes de comparar los niveles de PCA entre las dos cepas, fue necesario obtener un compuesto de referencia para poder usarlo como control en los experimentos. Con este fin, se purificó PCA a partir de 2 litros de cultivo de ID4365 crecida a 30°C. De este volumen, se obtuvieron 25 mg de cristales amarillos en forma de aguja. A pesar de que el rendimiento fue menor al reportado en otros artículos (Rane *et al.*, 2007), la cantidad purificada fue suficiente para realizar una

caracterización del compuesto a través de distintas pruebas.

En primer lugar, tanto el color como la forma de los cristales coinciden con las descripciones de PCA puro (Makarand *et al.*, 2007). Por otra parte, el punto de fusión alcanzado tras calentar los cristales en un aparato de Fisher-Johns fue de 236°C – 238°C, un intervalo de temperatura cercano al establecido para el PCA: 240°C – 242°C (Jayatilake *et al.*, 1996). A su vez, un barrido espectrofotométrico de los cristales disueltos en cloroformo reveló la presencia de dos picos: el mayor a 251 nm y el menor a 370 nm (Fig. 24). Se ha reportado que el PCA presenta dicho patrón (Rane *et al.*, 2007; Rane *et al.*, 2008). Finalmente, al correr una cromatografía de placa fina con diclorometano como solvente, se registró que los cristales disueltos en cloroformo migran con un Rf de 0.16 (Fig. 24), dato que coincide con descripciones previas del PCA (Brisbane *et al.*, 1987). Adicionalmente, al revelar la placa cromatográfica con reactivo de Dragendorff, el compuesto reaccionó positivamente. Esto indica que los cristales purificados pertenecen a la familia de los alcaloides, compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno. Una revisión a la estructura del PCA muestra que éste entra en dicha clasificación (Fig. 25).

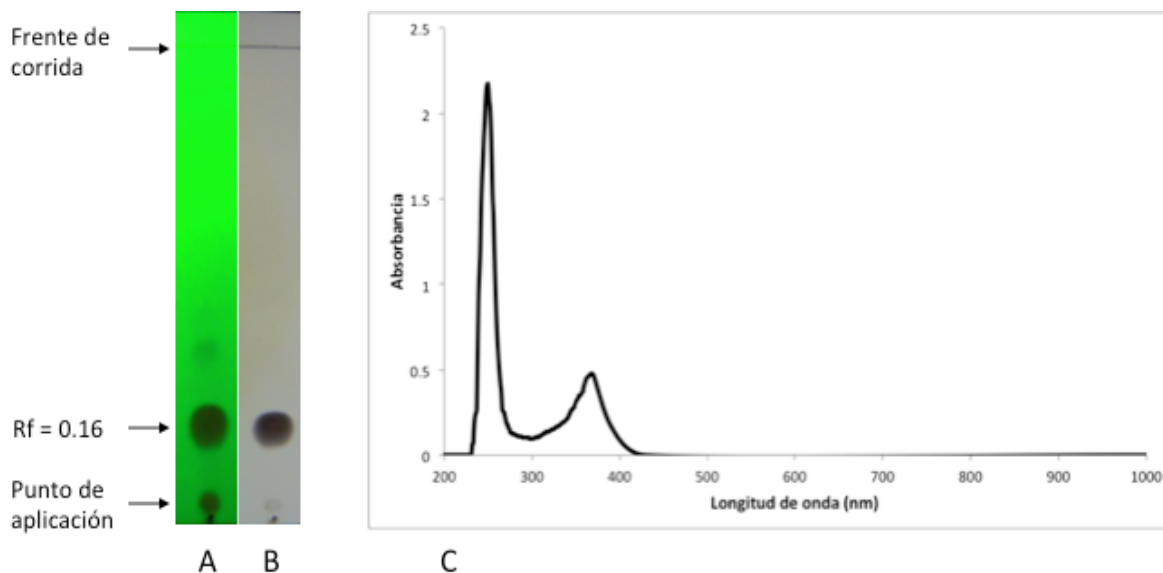


Figura 24. Caracterización del compuesto purificado. Cromatografía en capa fina (A) visualizada en luz UV de onda corta y (B) revelada con reactivo de Dragendorff. (C) Espectro de absorción de los cristales disueltos en cloroformo.

Aunado a lo anterior, se realizaron dos resonancias magnéticas (una de ^1H y otra de ^{13}C), una espectrofotometría de masas y una espectroscopía IR de los cristales purificados (Apéndice 1). Con ayuda del Dr. Manuel Jiménez Estrada, se interpretaron los datos y se llegó a la conclusión de que los resultados obtenidos en cada análisis coinciden con lo esperado para el PCA. Todos estos elementos permitieron confirmar la identidad de los cristales.

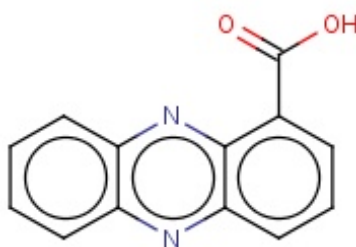


Figura 25. Estructura química del ácido fenazin-1-carboxílico (PCA)

Una vez obtenido el PCA puro, fue posible analizar los niveles de este compuesto. Para ello, se crecieron cultivos de PAO1 e ID4365 a 30°C y 37°C en medio PPGAS y, 36 horas después de haber alcanzado una densidad óptica de 1.0, los sobrenadantes crudos se acidificaron y extrajeron con cloroformo. Tras concentrar las muestras, se corrió una cromatografía en placa fina utilizando el PCA puro como control. El procedimiento se realizó por triplicado.

Como se aprecia en la Fig. 26, en relación a PAO1, ID4365 produjo una mayor cantidad de PCA sin importar la temperatura de crecimiento. Sin embargo, mientras que, en PAO1, los niveles de PCA fueron mayores cuando el cultivo creció a 37°C; en ID4365, los niveles fueron mayores cuando el cultivo creció a 30°C. De esta forma, el patrón de producción de PCA es similar al de piocianina, siendo la cepa ID4365 crecida a 30°C la que presenta mayor cantidad de ambos compuestos.

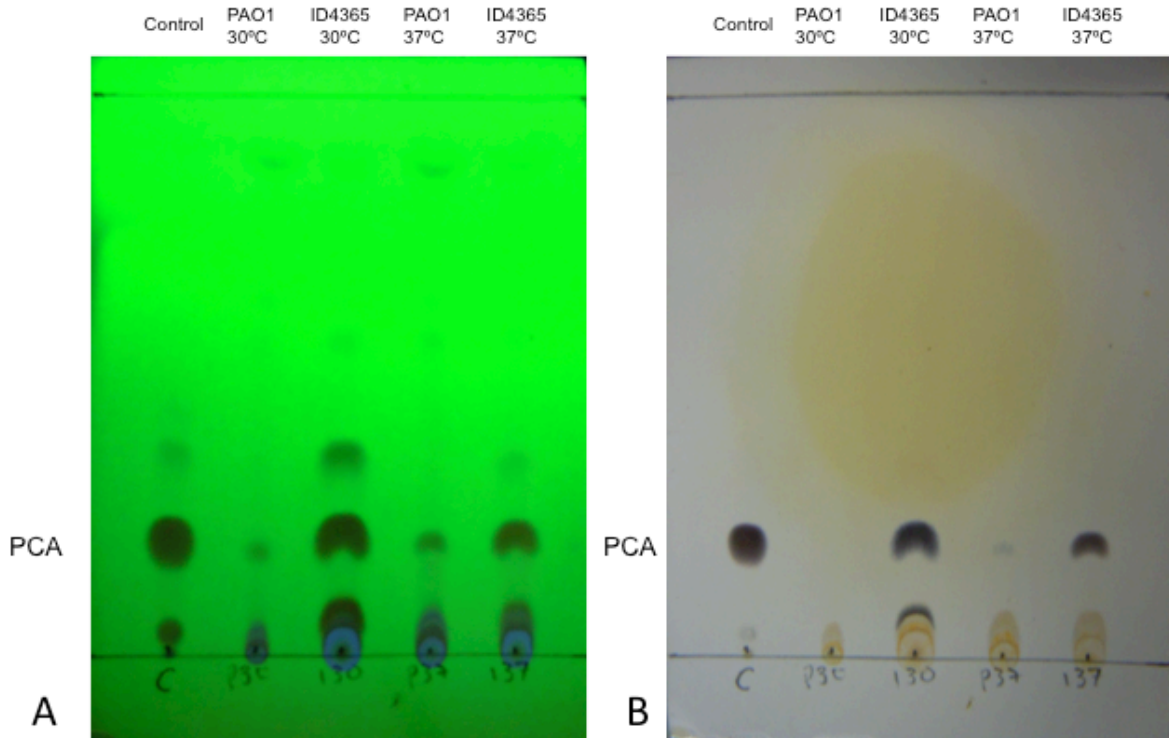


Figura 26. Producción de ácido fenazin-1-carboxílico (PCA) por las cepas PAO1 e ID4365 a 30 y 37°C. Cromatografía en placa fina (fase móvil – diclorometano puro) visualizada con luz UV de onda corta (A) y revelada con reactivo de Dragendorff (B).

Estos datos sugieren que el incremento en la producción de piocianina en ID4365 a 30°C está directamente relacionado con una sobreproducción de PCA. Lo anterior podría explicar por qué, a pesar de existir una mayor expresión de *phzM* a 37°C, los niveles de piocianina son mayores cuando la cepa crece a 30°C. A su vez, este resultado plantea un nuevo problema: ¿cuál es la razón detrás de la sobreproducción de PCA en la cepa ID4365 a 30°C? Esta pregunta podría ser abordada en un futuro.

6. Aumento en sistema rhIR

A pesar de las diferencias detectadas entre los patrones transcripcionales de los operones *phzABCDEFG* y del gen *phzM*, existe un punto común en todos ellos: la cepa ID4365 crecida a 37°C genera los niveles más altos de expresión. Para evaluar si lo anterior ocurre con otros genes regulados por “quorum sensing”, se introdujo el plásmido pMP_lectA en ambas cepas. Dicho plásmido tiene clonada

una fusión transcripcional del promotor del gen *lecA* de PAO1 con el gen *lacZ* (Fig. 27). El gen *lecA* codifica para lectina y es regulado positivamente por el sistema RhlR/RhlI (Winzer *et al.*, 2000)

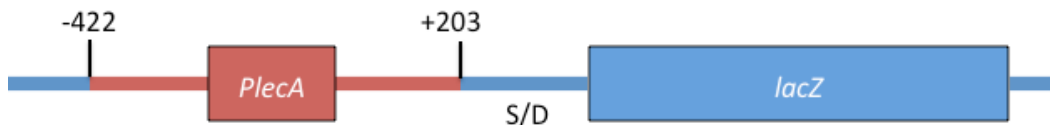


Figura 27. Mapa físico de la fusión transcripcional contenida en pMP_lecA. La numeración es relativa al sitio de inicio de la transcripción de *lecA* definido en Winzer *et al.* (2000); S/D es la secuencia Shine/Dalgarno del vector pMP220.

En la Fig. 28, se muestra que la actividad de β -galactosidasa resultó ser sumamente baja. De hecho, la mayoría de los datos registrados son similares a los valores basales producidos por el plásmido pMP220 sin inserto (Fig. 15B). Únicamente ID4365 crecida a 37°C se sale de esta tendencia, alcanzando alrededor de 25 U.M. en los dos últimos puntos. De esta forma, se repitió el mismo patrón de los ensayos previos: los niveles transcripcionales de ID4365 a 37°C son considerablemente mayores a los observados en el resto de los cultivos.

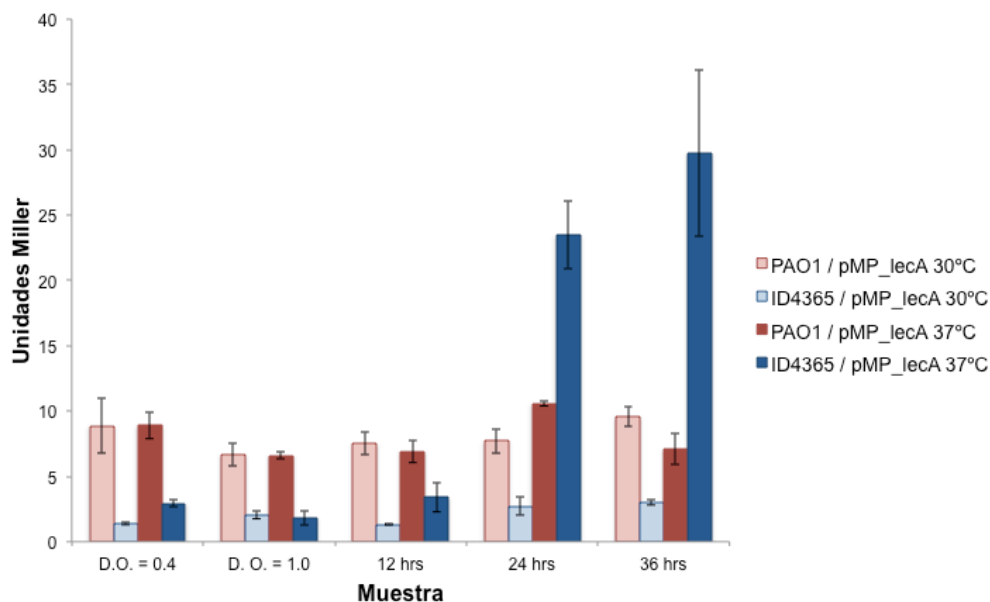


Figura 28. Actividad de β -galactosidasa del plásmido pMP_lecA en las cepas PAO1 e ID4365 a 30 y 37°C. Las barras de error representan la desviación estándar de la media obtenida de la medición de tres réplicas independientes.

Considerando que los promotores de *lecA*, *phzA1B1C1D1E1F1G1* y *phzM* contienen una caja *las* regulada principalmente por el complejo RhlR/C4, se planteó la posibilidad de que existiesen diferencias en el sistema de “quorum sensing” que pudieran explicar el patrón de ID4365 a 37°C. Con el fin de analizar esto, se compararon los niveles de C₄-HSL, el autoinductor sintetizado por RhlI. Para ello, se crecieron cultivos de PAO1 e ID4365 a 30°C y 37°C. Los sobrenadantes se extrajeron con acetato de etilo acidificado, se concentraron y se corrieron en una cromatografía en placa fina.

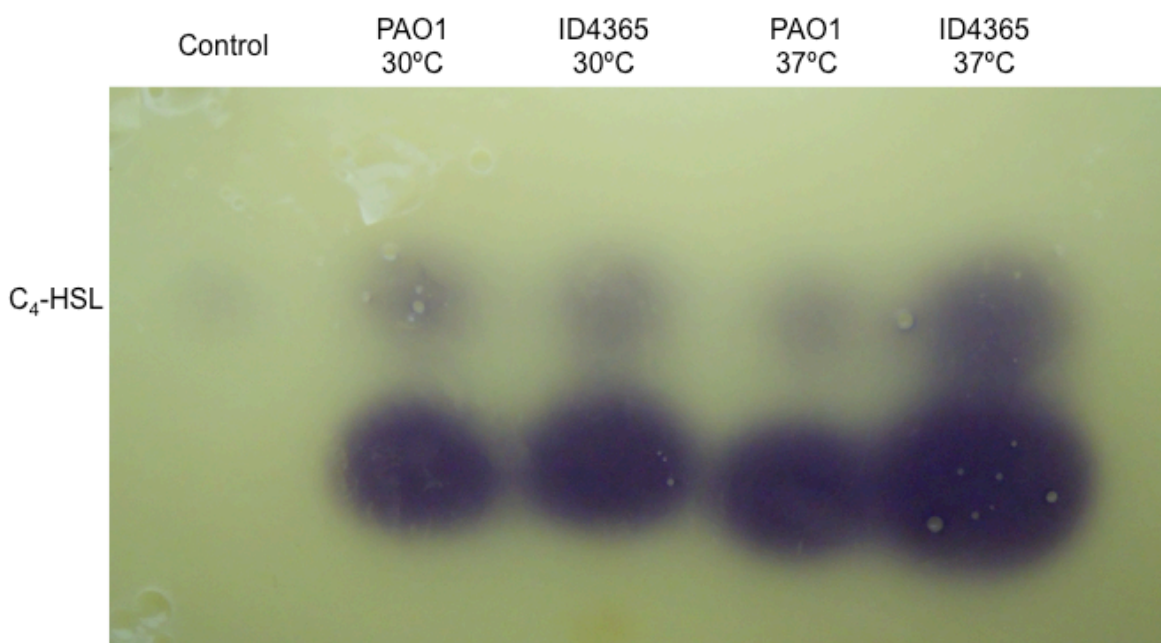


Fig. 29. Producción de *N*-butanoil homoserina lactona (C₄-HSL) por las cepas PAO1 e ID4365 a 30°C y 37°C. Cromatografía en capa fina revelada con *C. violaceum* 026. En cada muestra, se detectaron dos compuestos: el superior corresponde al autoinductor C₄-HSL.

Tras revelar la placa con *C. violaceum* 026, se detectó la presencia de dos compuestos (Fig. 29). Esto se debe a que esta bacteria no detecta exclusivamente C₄-HSL, sino que puede reaccionar con otras homoserina lactonas que hayan sido extraídas. Sin embargo, gracias a la presencia de C₄-HSL puro como control, se pudo identificar que el compuesto superior correspondía a este autoinductor.

Al analizar los niveles relativos de C₄-HSL, se puede observar que, cuando ID4365 crece a 37°C, ésta produce mayor cantidad de autoinductor que el resto. Dicha sobreexpresión supondría un aumento en la regulación del sistema RhIR/RhII y, como consecuencia, una mayor transcripción de los genes que componen su regulón. Así, este resultado podría explicar el incremento de la actividad transcripcional de los genes *lecA*, *phzA1B1C1D1E1F1G1* y *phzM* observado en la cepa ID4365 crecida a 37°C.

Conclusiones

- La sobreproducción de piocianina que presenta la cepa ID4365 respecto a PAO1 correlaciona, al menos en parte, con una sobreexpresión de los operones *phzABCDEFG*.
- El incremento en la expresión de *phzA1B1C1D1E1F1G1*, *phzM* y *lecA* en ID4365 a 37°C correlaciona con una sobreproducción del autoinductor C₄-HSL.
- El aumento en la producción de piocianina que se observa en ID4365 a 30°C no está relacionado con una mayor transcripción de los operones *phzABDEFG* y del gen *phzM*, sino con una sobreproducción de PCA a esta temperatura.

Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo dejan abierta la pregunta acerca de cuál es la razón detrás de la sobreproducción de PCA en ID4365 a 30°C. Algunas hipótesis que podrían ser abordadas posteriormente para resolver este problema son las siguientes:

- **Existe una diferencia en el metabolismo previo a la ruta biosintética de la piocianina.** Considerando que los niveles de PCA presentan el mismo patrón que los de piocianina, es posible que exista una sobreproducción del precursor de este compuesto. De esta forma, se podrían medir los niveles de ácido corísmico, el sustrato de los operones *phzABCDEFGF*, con el fin de buscar diferencias entre PAO1 e ID4365 a 30 y 37°C.
- **Los operones *phzABCDEFGF* podrían estar regulados diferencialmente a nivel traduccional.** Las conclusiones de este trabajo se obtuvieron a través de ensayos transcripcionales. Sin embargo, podría existir un patrón distinto a nivel traduccional. De hecho, lo anterior se ha observado en otras cepas de *P. aeruginosa*. Así, podrían diseñarse fusiones traducionales que permitiesen medir la expresión de los operones en las dos cepas.
- **Las proteínas PhzABCDEFGF de ID4365 presentan una mayor actividad catalítica a 30°C.** Aunque los niveles transcripcionales de los operones *phzABCDEFGF* son considerablemente mayores cuando el cultivo crece a 37°C, los productos podrían tener una actividad catalítica mayor cuando el cultivo crece a 30°C. Para evaluar esto, se podrían comparar las secuencias de los operones de ambas cepas. En caso de encontrarse mutaciones no sinónimas, se sustituirían los operones endógenos de PAO1 por los de ID4365 y, posteriormente, se analizaría la producción de piocianina.

Apéndice 1

Caracterización de PCA

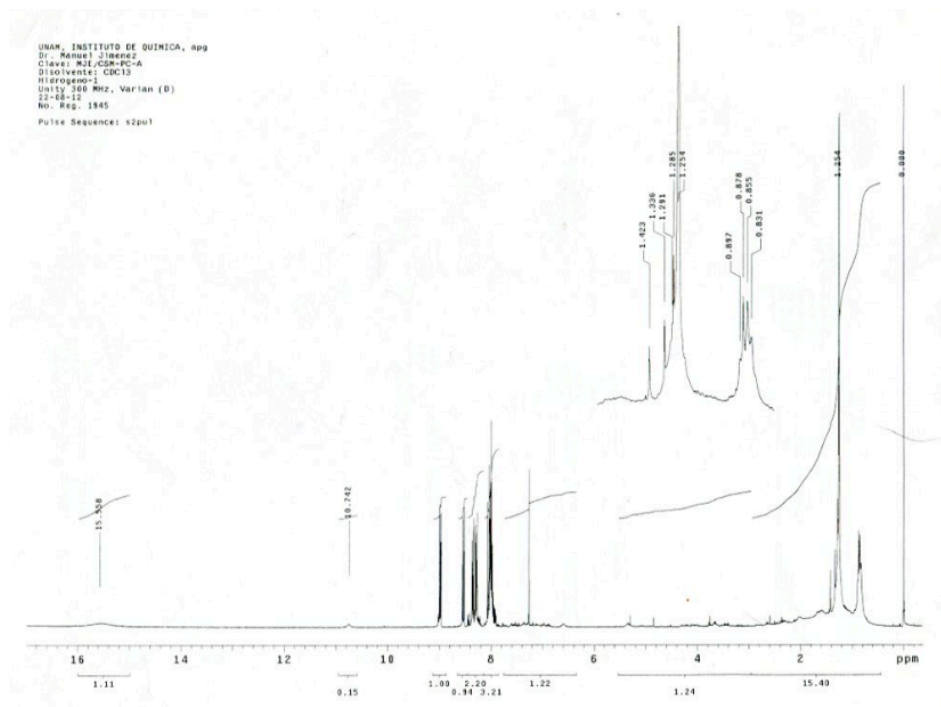


Figura 30. Resonancia magnética nuclear ^1H de los cristales purificados disueltos en cloroformo. Los datos obtenidos resultaron similares a los reportados para el PCA (Jayatilake *et al.*, 1996). Cada señal corresponde a uno de los hidrógenos presentes en la estructura de la molécula. Específicamente el hidrógeno del grupo carboxilo se ubicó a 15.558 ppm.

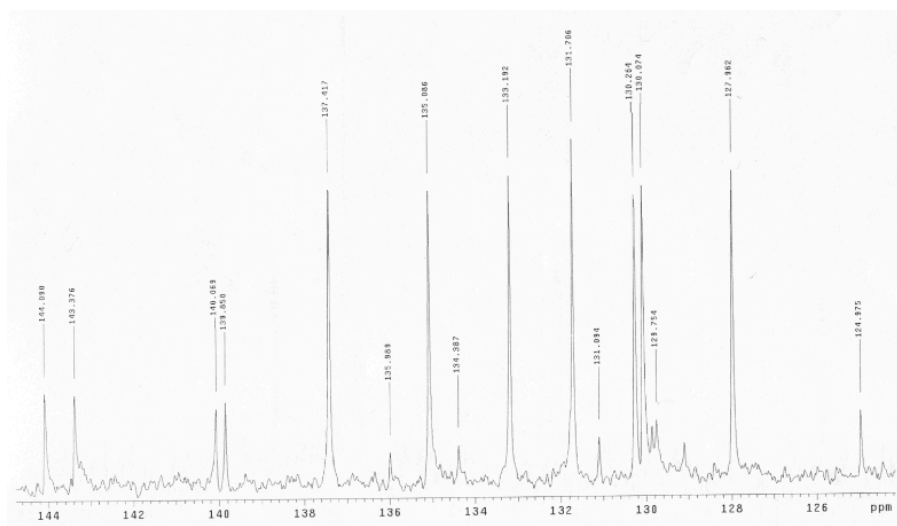


Figura 31. Resonancia magnética nuclear ^{13}C del compuesto purificado disuelto en cloroformo. Los datos obtenidos resultaron similares a los reportados para el PCA (Jayatilake *et al.*, 1996). Cada señal corresponde a uno de los 13 carbonos presentes en la estructura de la molécula.

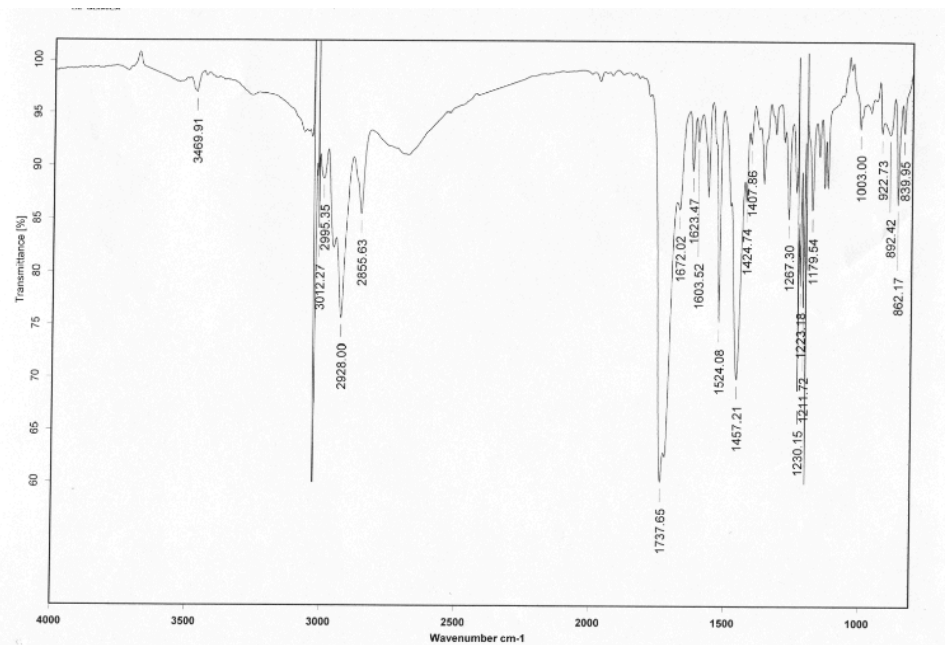


Figura 32. Espectroscopía infrarroja de los cristales purificados. Se observó un patrón de bandeado similar al descrito previamente para el PCA (Rane *et al.*, 2007). Específicamente, las absorciones a 1737 cm⁻¹ y 3469 cm⁻¹ confirmaron la presencia del grupo carboxilo.

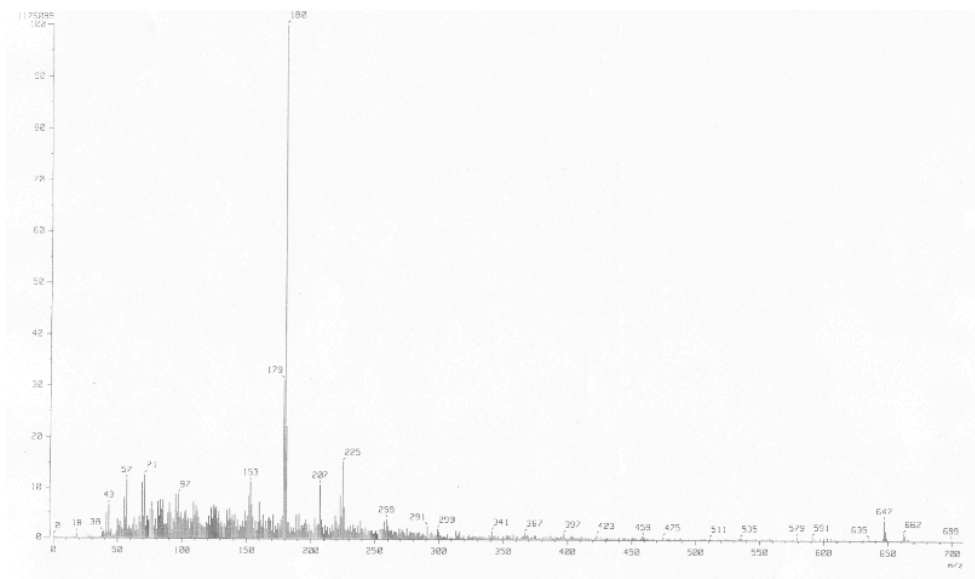


Figura 33. Espectrometría de masas de los cristales purificados. Se comprobó la presencia de un compuesto con masa molar de 225 g/mol. Considerando que el PCA (C₁₃H₈N₂O₂) tiene una masa molar de 224.2 g/mol, es muy probable que la señal observada corresponda a este compuesto.

Apéndice 2

Medios de cultivo, buffers y reactivos

Medio YT2X (Sambrook & Russell, 2001)

Bactotripton	1.6 g
Extracto de levadura	1.0 g
NaCl	0.7 g

Ajustar pH a 7.2 con NaOH 1N
Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

Medio LB (Sambrook & Russell, 2001)

NaCl	1.0 g
Bactotripton	1.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
Agar	1.5 g

Ajustar pH a 7.0 con NaOH 1N
Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

Medio SOB (Sambrook & Russell, 2001)

Triptona	2.0 g
Extracto de levadura	0.5 g
NaCl	0.05 g

Ajustar pH a 7.0 con NaOH 1N
Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

Medio PPGAS (Wilde *et al.*, 1997)

NH ₄ Cl	0.1068 g
KCl	0.1462 g
Tris	1.453 g
Peptona	1.0 g

Ajustar pH a 7.4 con HCl 1N

Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

Después de esterilizar, añadir:

MgSO ₄ 1.0 M	0.16 mL
Glucosa 20%	2.5 mL

Buffer Z (Miller, 1972)

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1.61 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0.55 g
KCl	0.075 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.0246 g

Ajustar pH a 7.0 con NaOH 1N

Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

Reactivo de Dragendorff (Baerheim-Svendsen & Verpoorte, 1983)

Solución A 0.5 g Bi(NO₃)₃.5H₂O disueltos en 20 mL de ácido acético 20%

Solución B 5 mL de KI 40% disuelto en agua

Antes de utilizarlo, mezclar 20 mL de solución A, 5 mL de solución B y 70 mL de agua.

Apéndice 3

Protocolos

1. Extracción de DNA cromosomal (Sambrook & Russell, 2001)

1. Centrifugar 1 mL de cultivo a 13500 rpm por 2 minutos. Eliminar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en solución de lisozima (2.5 mg/mL) y RNAsa (2 mg/mL)
2. Incubar la solución a 37°C por 10 minutos.
3. Añadir 250 µL de SDS 2% y vortexear hasta homogeneizar.
4. Añadir 250 µL de fenol-cloroformo y vortexear hasta homogeneizar
5. Centifugar a 13500 rpm por 2 minutos y rescatar el sobrenadante.
6. Repetir las extracciones con fenol cloroformo hasta que la interfase se vea limpia.
7. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio y precipitar con 0.1 volumen de acetado de sodio 3M y 1 volumen de isopropanol.
8. Rescatar el paquete celular con spooling.
9. Repetir la precipitación y el spooling hasta que el sobrenadante esté totalmente limpio.
10. Resuspender el paquete celular en un volumen pequeño de TE10mM

2. Preparaciones de plásmido (Sambrook & Russell, 2001)

1. Centrifugar 1 mL de cultivo a 13500 rpm por 2 minutos. Eliminar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 100 μ L de TE 25mM
2. Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Añadir 200 μ L de solución fresca de NaOH 0.2N / SDS 1%. Mezclar por inversión vigorosa hasta que se vea transparente, homogéneo y viscoso.
4. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Añadir 150 μ L de acetato de potasio 3M. Mezclar por inversión hasta que se pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco.
6. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Añadir 400 μ L de fenol-cloroformo, vortexear por 30 segundos y centrifugar a 13500 rpm por 2 minutos.
8. Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 1 mL de etanol absoluto frío. Dejar precipitando 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos. Retirar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 50 μ L de TE 10 mM.
10. Añadir 150 μ L de acetato de sodio 4M. Mezclar e incubar a -20°C por 1 hora.
11. Centrifugar a 13500 rpm por 10 minutos. Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y añadir 200 μ L de isopropanol.
12. Precipitar por 10 minutos y centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos. Eliminar todo el sobrenadante.
13. Resuspender en un volumen adecuado de TE10mM
14. Añadir RNAsa e incubar a 37°C por 1 hora.
15. Remover la RNAsa extrayendo con un volumen de fenol cloroformo
16. Precipitar con 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y 1 volumen de isopropanol.
17. Resuspender en un volumen pequeño de TE10mM

3. Transformación de *Escherichi coli* por electroporación (Sambrook & Russell, 2001)

1. Crecer un precultivo *E. coli* en medio SOB a 37°C durante 12 horas.
2. Inocular 20 mL de medio SOB con el precultivo hasta una densidad óptica a 600 nm de 0.1
3. Incubar a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6
4. Centrifugar a 5500 rpm por 5 minutos.
5. Lavar 3 veces en glicerol 10% frío.
6. Resuspender el paquete celular en 200 µL de glicerol 10%.
7. Colocar 60 µL en un tubo Eppendorf.
8. Añadir 2 µL de DNA plasmídico y homogeneizar con micropipeta.
9. Transferir la mezcla a una celda de electroporación mantenida en hielo.
10. Dar un pulso en el electroporador de 1.6 kV.
11. Agregar 1 mL de medio YT2X a la celda. Homogeneizar con micropipeta y transferir todo a un tubo de ensaye.
12. Incubar a 37°C durante 1 hora.
13. Hacer diluciones e inocular 0.1 mL de cada una en cajas con medio LB + antibióticos.
14. Incubar a 37°C durante toda la noche.

4. Transformación de *Pseudomonas aeruginosa* por electroporación (Smith & Iglewski, 1989)

1. Crecer un cultivo de *P. aeruginosa* en medio SOB a 37°C durante 12 horas.
2. Centrifugar a 13500 rpm por 2 minutos.
3. Descartar el sobrenadante y lavar 2 veces el paquete celular con sacarosa 10.3%
4. Juntar 50 µL de paquete celular en un tubo limpio.
5. Añadir 2 µL de DNA plasmídico y homogeneizar con micropipeta.
6. Transferir la mezcla a una celda de electroporación mantenida en hielo.
7. Dar un pulso en el electroporador de 1.6 kV.
8. Agregar 1 mL de medio YT2X a la celda. Homogeneizar con micropipeta y transferir todo a un tubo de ensaye.
9. Incubar a 37°C durante 2 horas.
10. Hacer diluciones e inocular 0.1 mL de cada una en cajas con medio LB + antibióticos.
11. Incubar a 37°C durante toda la noche.

5. PCR (Sambrook & Russell, 2001)

Para 50 mL de reacción, adicionar los siguiente componentes a un tubo limpio:

Buffer PCR 10X, - Mg	5 μ L
dNTP 10mM	1 μ L
MgCl ₂ 50mM	1.5 μ L
Mezcla de <i>primers</i> (10mM cada uno)	1 μ L
DNA (templado)	> 1 μ L
<i>Taq</i> DNA polimerasa	0.2 μ L
Agua destilada estéril	Aforar hasta 50

- Incubar el tubo en un termociclador a 95°C por 4 minutos.
- Realizar 30 ciclos con las siguientes características:

Desnaturalización 94°C por 1 minuto

Alineamiento 55°C por 1 minuto (la temperatura y le tiempo varían dependiendo los *primers* empleados y el tamaño del producto a amplificar

Polimerización 72°C por 2 minutos

- Analizar los productos amplificados a través de un gel de electroforesis.

6. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) (Sambrook & Russell, 2001)

1. Correr un gel de agarosa LMP al 0.6% y teñir con un bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) recién preparado. Iluminar el gel con luz UV de onda larga y cortar las bandas deseadas.
2. Transferir la banda a un tubo y fundirla a 65-70°C durante 10 minutos.
3. Añadir 0.1 volumen de NaCl 5M, mezclar e incubar a 65-70°C durante 5 minutos.
4. Saturar fenol con NaCl de la siguiente forma: mezclar 100 μL de NaCl 5 M, 400 μL de agua estéril y 500 μL de fenol en un tubo limpio. Centrifugar a 13500 rpm por 1 minuto y retirar la fase acuosa. Mantener el fenol saturado a 37°C.
5. Transferir la agarosa fundida a 37°C e incubar por 2 minutos.
6. Añadir 2/3 volumen de fenol saturado a la agarosa fundida y agitar en vórtex inmediatamente.
7. Centrifugar a 13500 rpm por 5 minutos y transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
8. Añadir 45 μL de TE 10mM y 5 μL de NaCl 5 M al fenol. Agitar en vórtex y centrifugar a 13500 rpm por 2 minutos. Recuperar la fase acuosa y mezclarla con la anterior.
9. Agregar 1 volumen de fenol-cloroformo a la fase acuosa, vortexear y centrifugar a 13500 rpm por 2 minutos.
10. Recuperar la fase acuosa y agregar 1 volumen de cloroformo. Vortexear y centrifugar a 13500 rpm por 2 minutos.
11. Transferir la fase acuosa y añadir 1 μL de glucógeno y 1 volumen de isopropanol. Incubar a -20°C por 2 horas.
12. Centrifugar a 13500 rpm por 10 minutos y descartar por completo el isopropanol
13. Secar el paquete celular y resuspender en un volumen adecuado de TE10mM.

7. Ligación con extremos cohesivos (Sambrook & Russell, 2001)

1. Cuantificar la concentración de vector e inserto digeridos y calcular el peso molar de cada uno de ellos.
2. Calcular los volúmenes de vector e inserto necesarios para obtener una razón 1:5 de peso molar
3. Adicionar los siguientes componentes a un tubo

Buffer Ligasa 5X	4 μ L
Vector digerido	Volumen calculado previamente
Inserto digerido	Volumen calculado previamente
Ligasa 1 U/ μ L	1 μ L
Agua estéril	Aforar hasta 20 μ L

4. Dejar incubando la reacción durante 12 horas a temperatura ambiente.

Bibliografía

Baerheim-Svendsen, A. and R. Verpoorte. 1983. Chromatography of alkaloids: thin-layer chromatography. Elsevier. 534 pp.

Bergen, G. A., & J. H. Shelhamer. 1996 Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. Infectious Disease Clinics of North America 10: 297-325.

Bodey, G. P., R. Bolivar, V. Fainstein and L. Jadeja. 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Reviews of Infectious Diseases 5 (2): 279 – 313.

Brewer SC, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV (1996) Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. Chest 109: 1019–1029.

Brisbane, P. G., L. J. Janik, M. E. Tate and R. F. Warren. 1987. Revised structure for the phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* 2-79. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 31 (12): 1967 – 1971.

Cogen, A. L., V. Nizet and R. L. Gallo. 2009. Skin microbiota: a source of disease or defence?. British Journal of Dermatology. 158 (3): 442 – 455.

Denning, G.M. et al. (1998) *Pseudomonas* pyocyanine alters calcium signaling in human airway epithelial cells. American Journal of Physiology. 274, L893–L900

Dietrich L. E., A. Price-Whelan, A. PeterseN, M. Whiteley, D. K. Newman. 2006. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. Molecular Microbiology. 61:1308 – 1321.

Diggle, S. and S. Atkinson. "QS in *Vibrio fischeri*" The quorum sensing site. 2011. < <http://www.nottingham.ac.uk/quorum/fischeri3.htm>> (Fecha de acceso: 02/09/2002)

Drenkard, E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infections*. 5(13): 1213 -1219.

Dunlap, P. 1999. Quorum regulation of luminiscence in *Vibrio fischeri*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1(1): 5 – 12.

Dropulic, L. K., J. M. Leslie, L. J. Eldred, J. Zenilman and C. L. Sears. 1995. Clinical manifestations and risk factors of *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with AIDS. *The Journal of Infectious Diseases* 171 (4): 930 – 937.

Egland, K. A. and E. P. Greenberg. 2000. Conversion of the *Vibrio fischeri* transcriptional activator LuxR to a repressor. *Journal of Bacteriology*. 182, 805–811.

Eschbach, M., K. Schreiber, K. Trunk, J. Buer, D. Jahn, and M. Schobert. 2004. Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *Journal of Bacteriology* 186:4596–4604.

Fuqua, W.C., M. Parsek, and E. P. Greenberg. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum-sensing. *Annual Reviews of Genetics* 35, 439–468.

Fuqua, C. 2006. The QscR quorum-sensing regulon of *Pseudomonas aeruginosa*: an orphan claims its identity. *Journal of Bacteriology* 188(9): 3169 – 3171.

Grant, S. G., J. Jessee, F. R. Bloom and D. Hannan. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants, *PNAS* 87: 4645 – 4649.

Gray, K.M., L. Passador, B. H. Iglewski and E. P. Greenberg. 1994. Interchangeability and specificity of components from the quorum-sensing regulatory systems of *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 176, 3076–3080.

Greenberg, E.P. 1997 Quorum sensing in gram-negative bacteria. *ASM News*. 63, 371–377.

Greenhagen, B. T., K. Shi, H. Robinson, S. Gamage, A. K. Bera, J. E. Ladner and J. F. Parsons. 2008. Crystal structure of the pyocyanin biosynthetic protein PhzS. *Biochemistry* 47(1): 5281 – 5289.

Goldberg JB (2000) *Pseudomonas*: global bacteria. *Trends in Microbiology* 8: 55–57.

Hammer A. S., K. Pedersen, T. H. Andersen, J. C. Jorgensen and H. H. Dietz. 2003. Comparison of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from mink by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology* 94:237–243.

Hardalo, C. and S. C. Edberg. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Critical Reviews in Microbiology* 23: 47-75.

Hastings J. W. and E. P. Greenberg. 1999. Quorum sensing: The explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. *Journal of Bacteriology*. 181, 2667–2668.

Hentzer, M., H. Wu, J. B. Andersen, K. Riedel, T. B. Rasmussen, N. Bagge, N. Kumar, M. A. Schembri, Z. Song, P. Kristoffersen, M. Manefield, J. W. Costerton, S. Molin, L. Eberl, P. Steinberg, S. Kjelleberg, N. Hoiby, and M. Givskov. 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *The EMBO Journal*. 22:3803–3815.

Hogan D. A. and R. Kolter. 2002. *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science* 296:2229–2232.

Huang J.F., Y. Q. Xu, H. Y. Zhang, Y. Q. Li, X. Q. Huang, B. Ren and X. Zhang. 2009. Temperature- dependent expression of *phzM* and its regulatory genes *lasI* and *ptsP* in rhizosphere isolate *Pseudomonas* sp. strain M18. *Applied Environmental Microbiology* 75: 6568–6580.

Jander G., L. G. Rahme and F. M. Ausubel. 2000. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *Journal of Bacteriology* 182:3843–3845.

Jayatilake, G. S., M. P. Thornton, A. C. Leonard, J. E. Grimwade and B. J. Baker. 1996. Metabolites from an antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Natural Products* 59: 293 – 296.

Jimenez, N. P., G. Koch, J. A. Thompson, K. B. Xavier, R. H. Cool and W. J. Quax. 2012. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (1): 46 – 65.

Kamath, J.M. et al. 1995. Pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* inhibits prostacyclin release from endothelial cells. *Infection and Immunity*. 63, 4921–4923

Konkel, M. E. and K. Tilly. 2000. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes and Infection* 2: 157-166.

Latifi, A., M. K. Winson, M. Foglino, B. W. Bycroft, G. Stewart, A. Lazdunski and P. Williams. 1995. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Molecular Microbiology* 17(2): 333 - 343.

Lau, G.W. et al. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infection and Immunity*. 72, 4275–4278

Lau, G. W., D. J. Hassett, H. Ran and F. Kong. 2004b. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *TRENDS in Molecular Medicine*

10(12): 599 – 606.

Lequette, Y., J.-H. Lee, F. Ledgham, A. Lazdunski, and E. P. Greenberg. 2006. A distinct QscR regulon in the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing circuit. *Journal of Bacteriology*. 188:3365–3370.

Lee, J. H., Y. Lequette and E. P. Greenberg. 2006. Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor. *Molecular Microbiology* 59(2): 602 – 609.

Li, Y., X. Du, Z. J. Lu, D. Wu, Y. Zhao, B. Ren, J. Huang, X. Huang, Y. Xu and Y. Xu. 2011. Regulatory feedback loop of two *phz* gene clusters through 5'-untranslated regions in *Pseudomonas* sp. M18. *PLoS ONE* 6 (4): e19413

Livermore, D. 2001. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases* 34: 634 – 640.

Lyczak, J.B. et al. (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infections*. 2, 1051–1060

Mahajan-Miklos S., M. W. Tan, L. G. Rahme and F. M. Ausubel. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96:47–56.

Manwar, A. V., S. R. Khandelwal, B. L. Chaudhari, J. M. Meyer and S. B. Chincholkar. 2003. Siderophore production by a marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118: 243 – 251.

Mavrodi, D.V., R. F. Bonsall, S. M. Delaney, M. J. Soule, G. Phillips and L. S. Thomashow. 2001 Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine- 1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of*

Bacteriology 183: 6454–6465.

Medina, G., K. Juárez, R. Díaz and G. Soberón-Chávez. 2003. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR* encoding a quorum sensing regulatory protein. *Microbiology UK* 149: 3073–3081.

Mentel, M., E. G. Ahuja, D. V. Mavrodi, R. Breinbauer, L. S. Thomashow and W. Blankenfeldt. 2009. Of two make one; the biosynthesis of phenazines. *ChemBioChem* 10: 2295 – 2304.

Miller, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory. Michigan. 466 pp.

Palleroni, N. J. 1984. Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. *In*: N. R. Kreig and J. G. Holt (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins. Baltimore, MA. 141–199.

Parsons, J., B. T. Greenhagen, K. Shi, K. Calabrese, H. Robinson, and J. E. Ladner. 2007. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 46(7): 1821 – 1828.

Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., and Iglewski, B.H. 1997. Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 179, 3127–3132.

Pierson, L. S. & E. A. Pierson. 2010. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86: 1659 – 1670.

Rahme L. G., E. J. Stevens, S. F. Wolfort, J. Shao, R. G. Tompkins, F. M. Ausubel. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268: 1899–1902.

Rane, M. R., P. D. Sarode, B. L. Chaudhari and S. B. Chincholkar. 2007. Detection, isolation and identification of phenazine-1-carboxylic acid produced by biocontrol strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Scientific & Industrial Research* 66: 627-631.

Rane, M. R., P. D. Sarode, B. L. Chaudhari and B. Chincholkar. 2008. Exploring antagonistic metabolites of established biocontrol agent of marine origin. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151: 665 – 675.

Richards, M. J., J. R. Edwards, D. H. Culver, and R. P. Gaynes. 1999. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States: National Infections Surveillance System. *Critical Care Medicine*. 27:887–892.

Rumbaugh, K. P., J. A. Griswold, B. H. Iglewski and A. N. Hamood. 1999. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infection and Immunity* 67 (11): 5854 – 5862.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: a laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001

Schuster, M., C. P. Lostroh, T. Ogi, and E. P. Greenberg. 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *Journal of Bacteriology*. 185:2066–2079.

Smith, A. W. and B. H. Iglewski. 1989. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Research* 17(24): 10509.

Soberón-Chávez, G., M. Aguirre-Ramírez. and L. Ordóñez. 2005. Is *Pseudomonas aeruginosa* only “sensing quorum”? Critical Reviews in Microbiology 31: 171 – 182.

Sorensen, R.U. and Klinger, J.D. (1987) Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments. Antibiotics and Chemotherapy. 39, 113–124

Spaink, H. P., R. J. Okker, C. A. Wijffelman, E. Pees and B. J. Lugtenberg. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. Plant Molecular Biology 9: 27 – 39.

Spencer DH, Kas A, Smith EE, Raymond CK, Sims EH, et al. (2003) Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 185: 1316–1325.

Spiker, T., T. Coenye, P. Vandamme and J. J. LiPuma. 2004. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. Journal of Clinical Microbiology 42 (5): 2074 – 2079.

Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F.S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsenk, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory & M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 406: 959 – 964.

Thomas, F. C., C. A. Woeng, G. V. Bloemberg and B. J. Lugtenberg. 2002. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas aeruginosa*. New Phytologist 157: 503 -523.

Urbanczyk, H., J. C. Ast, M. J. Higgins, J. Carson and P. V. Dunlap. 2007. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. And *Aliivibrio wodanis* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57(12): 2823 – 2829.

Wagner, V. E., D. Bushnell, L. Passador, A. I. Brooks, and B. H. Iglewski. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. Journal of Bacteriology. 185:2080–2095.

Wild, M., A. D. Caro, A. L. Hernández, R. M. Miller, G. Sobrerón-Chávez. 1997. Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. FEMS Microbiology Letters 153: 279 – 285.

Winzer, K., C. Falconer, N. C. Garber, S. P. Diggle, N. Camara and P. Williams. 2000. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. Journal of Bacteriology 182 (22): 6401 – 6411.

Wolfgang, M. C., B. R. Kulasekara, X. Liang, D. Boyd, K. Wu, Q. Yang, C. Garrett Miyada and S. Lory. 2003. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. PNAS 100 (14): 8484 – 8489.

Wurtzel, O., D. R. Yoder-Himes, K. Han, A. A. Dandekar, S. Edelheit, E. P. Greenberg, R. Sorek and S. Lory. 2012. The single-nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body temperature. PLoS Pathogens 8(9): e1002945.

Yanisch-Perron, D., J. Vieira and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and PUC19 vectors. Gene 33: 103 – 119.

Zimin, A. V., D. R. Kelley, M. Roberts, G. Marçais, S. L. Salzberg and J. A. Yorke. 2012. Mis-assembled “segmental duplications” in two versions of the *Bos taurus* genome. pLoS ONE 7(8): e42680.