



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

Regulación del operón *rmlBDAC* por el sistema sensor de quórum Rhl en *Pseudomonas aeruginosa*.

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA:
M. EN E. MARISELA AGUIRRE RAMÍREZ

TUTORA: DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. MA. DEL CARMEN GÓMEZ EICHELMANN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D. F. ENERO 2013



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección de la Dra. Gloria Soberón Chávez en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Gloria Soberón Chávez	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dra. Ma. del Carmen Gómez Eichelmann	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. José Luis Puente García	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Miguel Ángel Ramírez Romero, del Programa de Genómica Evolutiva del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los análisis *in silico*.

Se reconoce la colaboración del Dr. Manuel Miranda Aragón, del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Fronteras de la Universidad de Texas en El Paso (UTEP), en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de mutagénesis dirigida.

Se reconoce la asesoría técnica de los Dr. Humberto García Arellano y Dr. Gerardo Medina Basulto en los experimentos de actividad transcripcional e identificación de inicios de transcripción.

Se reconoce la asesoría técnica de la M. en C. Abigaíl González Valdez y la M. en C. María Victoria Grosso Becerra en los experimentos de caracterización de la caja *las*.

El proyecto fue apoyado parcialmente por Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (50201) Programa de Apoyo Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-Dirección General Asuntos del Personal Académico (PAPIIT-DGAPA), UNAM (IN200707).

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día:

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente:	Dr. Sergio Sánchez Esquivel	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal:	Dr. Luis Servín González	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dr. Dimitris Georgellis	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Vocal	Dr. Enrique Merino Pérez	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo	Instituto de Biotecnología, UNAM

DEDICATORIAS

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

Reconocimientos.....	I
Dedicatorias y Agradecimientos.....	II
Índice.....	III
Índice de Tablas y Figuras.....	IV
Resumen.....	V
Abstract	VI
1. Introducción	
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2. Producción de factores de virulencia.....	1
1.3. Respuesta sensora de quórum en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.4. Síntesis de dTDP-L-ramnosa, precursor de ramnolípidos y LPS.....	7
1.5. Regulación dependiente de RhlR y σ^S	10
2. Antecedentes.....	15
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivos.....	16
5. Metodología	
5.1. Condiciones de cultivo.....	17
5.2. Cuantificación de la actividad de β -galactosidasa.....	18
5.3. Manipulación de ácidos nucleicos y amplificaciones.....	19
5.4. Construcción de las fusiones transcripcionales <i>rmIB::lacZ</i>	19
5.5. Transformación bacteriana.....	20
5.6. Búsqueda de inicios de transcripción.....	20
5.7. Mutagénesis dirigida.....	21
5.8. Transducción de la mutación <i>rpoN</i>	21
6. Resultados y Discusión	
6.1. La expresión del operón <i>rmIBDAC</i> depende de RhlR y σ^S	23
6.2. La caja <i>las</i> atípica es funcional	32

6.3. La inducción del operón <i>rmIBDAC</i> es independiente del medio de cultivo y la temperatura.....	34
7. Conclusiones.....	37
8. Perspectivas.....	38
9. Referencias.....	39
 Anexo I. Artículo: The <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>rmIBDAC</i> operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhIR and the alternative sigma factor σ^S	47

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Índice de tablas

Tabla 1. Reguladores de la respuesta QS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
Tabla 2. Relación de las cajas <i>las</i> y los genes regulados por los sistemas <i>las</i> y <i>rhl</i>	11
Tabla 3. Lista de material biológico.....	17
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este estudio.....	19

Índice de figuras

Figura 1. Factores de virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
Figura 2. Sistema jerárquico sensor de quórum de <i>P. aeruginosa</i>	4
Figura 3. Ruta biosintética de la dTDP-L-ramnosa.....	8
Figura 4. Estructura del “core” del LPS de <i>P. aeruginosa</i>	10
Figura 5. Secuencia consenso para el reconocimiento por σ^{70} y σ^S	14
Figura 6. Secuencia intergénica entre PA5160 y <i>rmIB</i>	23
Figura 7. Fusiones transcripcionales <i>rmIB::lacZ</i>	24
Figura 8. Expresión de las fusiones <i>rmIBDAC::lacZ</i> en distintos fondos genéticos.....	27
Figura 9. Caracterización de la región promotora del operón <i>rmIBDAC</i>	28
Figura 10. Efecto de <i>rpoN</i> sobre la expresión del operón <i>rmIBDAC</i>	29
Figura 11. Expresión de las mutantes en la caja -10 del promotor P2 y la caja <i>las</i> atípica del operón <i>rmIBDAC</i>	30
Figura 12. Expresión de la mutante -10 del promotor P3 en el fondo genético <i>rhIR</i>	31
Figura 13. Actividad transcripcional de la fusión <i>rmIB::lacZ(1)</i> en distintas condiciones de cultivo.....	35
Figura 14. Identificación de los inicios de transcripción del promotor de <i>rmIB</i> en distintos medios de cultivo y temperaturas.....	36

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa produce los biosurfactantes ramnolípidos (rhls), los cuales son compuestos tensioactivos que, además de estar asociados a la virulencia de la bacteria, presentan un uso biotecnológico potencial. *P. aeruginosa* sintetiza dos familias de ramnolípidos dependiendo del número de residuos de ramnosa que contengan (mono- y di-rhls). Se sabe que el operón *rmIBDAC* codifica las enzimas involucradas en la síntesis de dTDP-L-ramnosa, azúcar precursor tanto de la biosíntesis del antígeno O del lipopolisacárido (LPS) como de la producción de mono y diramnolípidos. Estudios de expresión heteróloga en *Escherichia coli* han demostrado que la dTDP-L-ramnosa es un factor limitante para la producción de ramnolípidos. Además, la expresión de los genes de biosíntesis de ramnolípidos (*rhlAB* y *rhlC*) forman parte del regulón *rhl* de la respuesta QS, que se sobre expresan durante la fase estacionaria para aumentar la producción de ramnolípidos.

El objetivo del presente trabajo es determinar los mecanismos de regulación del operón *rmIBDAC* en condiciones de baja y alta producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa*. La expresión del operón *rmIBDAC* se cuantificó a través de la actividad de β -galactosidasa de diversas fusiones transcripcionales con *lacZ* evaluadas en diversos fondos genéticos. Los resultados obtenidos mostraron que el promotor de *rmIB* se expresa constitutivamente durante la fase exponencial de crecimiento. La expresión del operón *rmIBDAC* aumentó durante la fase estacionaria de manera independiente al medio de cultivo (LB, baja producción de ramnolípidos o PPGAS, alta producción de ramnolípidos). Dicha inducción de la expresión depende de los reguladores RhIR y σ^S . El operón *rmIBDAC* se expresa a partir de tres promotores. Los promotores P1 y P3 son responsables de la expresión basal del operón *rmIBDAC* a lo largo de la curva de crecimiento, y se expresan de manera independiente a RhIR. El promotor P2 depende parcialmente de RhIR y σ^S . Este promotor presenta una caja las atípica ubicada 44.5 bases río arriba del promotor P2. Este es el primer trabajo que identifica una caja *las* atípica funcional que reconoce específicamente RhIR.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa produces rhamnolipid biosurfactants (rhls) that are tension-active surface compounds. These molecules besides being associated with the virulence of this bacterium, have a potential biotechnological use. *P. aeruginosa* synthesizes two rhamnolipids families based on the number of residues containing rhamnose (mono- and di-rhls). It is known that the *rmIBDAC* operon encodes enzymes involved in dTDP-L-rhamnose synthesis, which is one of the sugar precursors of the O antigen lipopolysaccharide (LPS) and also of mono- and di-rhls. Heterologous expression in *Escherichia coli* has shown that dTDP-L-rhamnose is a limiting factor for rhls production. Furthermore, the expression of the biosynthetic rhamnolipids genes (*rhlAB* and *rhlC*) which is induced at the stationary phase of growth, depends on the quorum sensing (QS) *rhl* regulon.

The aim of this project is to determine the regulatory mechanisms of operon *rmIBDAC* under low and high rhamnolipids production conditions in *P. aeruginosa*. *rmIBDAC* operon expression was quantified through β -galactosidase activity expressed by various transcriptional fusions with *lacZ* gen. These transcriptional *lacZ* fusions were evaluated in different genetic background. The results obtained showed that *rmIB* promoter is constitutively expressed during the exponential phase of growth, and that *rmIBDAC* operon expression increased during the stationary phase independently of the culture medium, (LB medium where low levels of rhls are produced and PPGAS medium where a high production of rhls is achieved). This induction depends on the QS transcriptional regulator RhIR and the stationary sigma factor, σ^S . *rmIBDAC* operon is expressed from three different promoters: P1 and P3 promoters are responsible for basal expression of the operon *rmIBDAC* along the growth curve, and are expressed independently of RhIR. The P2 promoter is partially dependent RhIR and σ^S and contains an atypical *las* box at 44.5 base from P2 promoter. This is the first work that identifies an atypical *las* box that is functional and specifically recognizing by RhIR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa que pertenece a la clase γ -proteobacteria (Soberón-Chávez, 2001). *P. aeruginosa* es ubicua y puede encontrarse en ambientes tan diversos como suelos (Atzél y col., 2008), dunas (Gaonkar y col., 2012), mares (Khan y col., 2008), aguas someras (Selezska y col., 2012), aguas prístinas (Wingender y Flemming, 2011; Mena y Gerba, 2009) y residuales (Schwartz y col., 2006); además de colonizar los tejidos de plantas (Bardoel y col., 2011; Starkey y Rahme, 2009) y animales (insectos, nemátodos, peces y mamíferos) (Limmer y col., 2011; Zaborina y col., 2009; Clatworthy y col., 2009). *P. aeruginosa* presenta una alta versatilidad metabólica que le permite habitar ambientes tan peculiares como el petróleo (Karadzic y col., 2006) o utilizar hidrocarburos alifáticos, compuestos aromáticos y solventes halogenados como fuente de carbono (Soberón-Chávez, 2001).

En humanos es un patógeno oportunista y es la tercer bacteria más frecuente en la infecciones intrahospitalarias. Los individuos inmunocomprometidos y pacientes que padecen fibrosis quística son susceptibles a desarrollar infecciones secundarias por dicha bacteria (Martin y Yost, 2011; Hauser y col., 2011; Moore y Flaws; 2011; Lyczak y col., 2000). Existen dos elementos intrínsecos a *P. aeruginosa* que potencian su patogenicidad: a) su alta resistencia natural a antibióticos (Breidenstein y col., 2011) y b) su variada producción de factores de virulencia (Girard y Bloemberg, 2008; Van Delden e Iglewski, 1998).

1.2. Producción de factores de virulencia

Los factores de virulencia son bioproductos que favorecen la invasión y patogenicidad de los microorganismos (Kipnis y col., 2006). *P. aeruginosa* sintetiza más de veinte factores de virulencias distintos (<http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs>), los cuales se pueden dividir en dos grandes grupos (Figura 1): los asociados a la

célula (lipopolisacáridos, flagelo, pili tipo IV, sistemas de secreción y alginato) y los exoproductos (ramnolípidos, autoinductores, exotoxinas, proteasas, ácido cianhídrico, piocianina y sideróforos). Dichos factores favorecen la colonización e invasión del hospedero y la protección de la bacteria del sistema inmune de vertebrados (Van Delden e Iglewski, 1998). La expresión de los factores de virulencia depende de la respuesta sensora de quórum (Schuster y Greenberg, 2006).

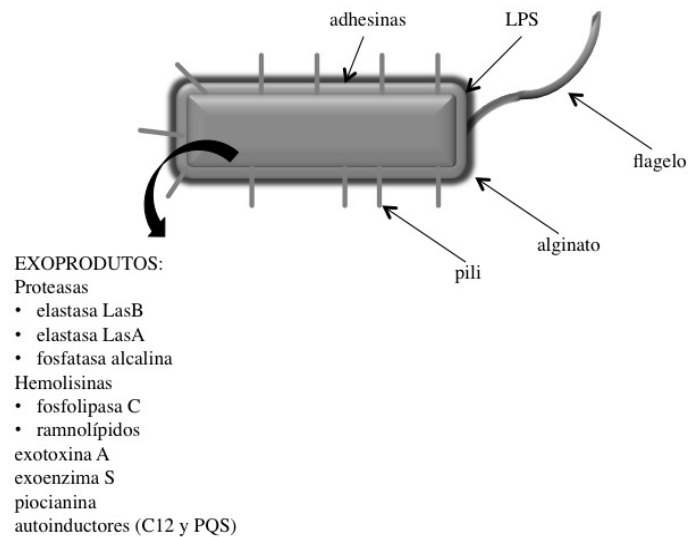


Figura 1. Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Las flechas rectas indican los factores de virulencia asociados a la bacteria, la lista de exoproductos está señalada por la flecha curvilinea. LPS, lipopolisacáridos; C12, 3-oxo-dodecanoil homoserina lactona; PQS, 2-heptil-3-hidroxy-4-quinolona. Modificado de Van Delden e Iglewski, 1998.

1.3. Respuesta sensora de quórum en *Pseudomonas aeruginosa*

La respuesta sensora de quórum (“quorum sensing response”, por sus siglas en inglés, QS) induce la expresión de más de 300 genes (Hentzer y col., 2003; Schuster y col., 2003; Wagner y col., 2003), dentro de los cuales se encuentran los genes productores de los factores de virulencia (Smith e Iglewski, 2003) y de ramnolípidos (Soberón-Chávez y Miller, 2000). Estos últimos son biosurfactantes relacionados en la formación de biopelículas (Davey y col., 2003) y la utilización de hidrocarburos como fuente de carbono (Zhang y Miller, 1992).

La respuesta QS fue descrita inicialmente en la bacteria marina *Allivibrio fischeri*; la cual, al aumentar su población, produce luz en los órganos especializados de algunos peces y calamares (Fuqua y col., 2001). Por lo tanto, la respuesta QS es un mecanismo de regulación de los genes de bioluminiscencia en condiciones de alta densidad poblacional. Esto se debe a que la bacteria sintetiza y secreta al medio una molécula inductora (3-oxo-hexanoil homoserina lactona) que al acumularse interactúa con el factor transcripcional LuxR e induce la síntesis de luciferasa (Greenberg, 1999; Urbanowski y col., 2004).

La respuesta QS en *P. aeruginosa* es de mayor complejidad que la observada en *A. fischeri*, no solo por ser un sistema que involucra múltiples vías; sino por estar modulada por factores medioambientales y por diversas condiciones de estrés (Soberón-Chávez y col., 2005a). La expresión de los genes regulados por la respuesta QS en *P. aeruginosa* depende de la expresión jerárquica de los regulones *las* y *rhl* y de la síntesis de dos autoinductores (AIs), 3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona (3O-C₁₂-HSL) y butanoil-homoserina lactona (C₄-HSL). Estos AIs son sintetizados por las homoserina lactona sintasas LasI y RhII, respectivamente (Schuster y col., 2003; Wagner y col., 2003). Ambos AIs al unirse a sus respectivos reguladores RhIR y LasR, activan la transcripción de diversos genes.

La respuesta QS (Figura 2) inicia con la síntesis basal del regulador transcripcional LasR y del autoinductor 3O-C₁₂-HSL (*lasI*, 3O-C₁₂-HSL sintasa). Éste se acumula al aumentar la densidad celular y alcanza una concentración umbral que favorece la dimerización de LasR (Kiratisin y col., 2002). El complejo LasR/3O-C₁₂-HSL induce la expresión de varios factores de virulencia (FV) y de los genes regulatorios del segundo sistema QS, *rhl*. La enzima RhII sintetiza al autoinductor C₄-HSL, éste interactúa con RhIR y juntos activan la expresión de otro conjunto de genes biosintéticos de FV (Soberón y col., 2005). Específicamente, RhIR promueve la expresión de los genes involucrados en la síntesis de ramnolípidos

(*rhIAB* y *rhIC*). Adicionalmente RhIR, en ausencia de C₄-HSL, puede actuar como represor de algunos genes como *rhIA*, *rhIR*, y *lasB* (elastasa B) (Medina y col., 2003c; Anderson y col., 1999) y en presencia de su AI puede activar la expresión de *rhIA*, *lecA* (lectina PA-IL) y el operón *phzA1B1C1D1E1F1G1* (Medina y col., 2003c; Winzer y col., 2000; Gallagher y col., 2002).

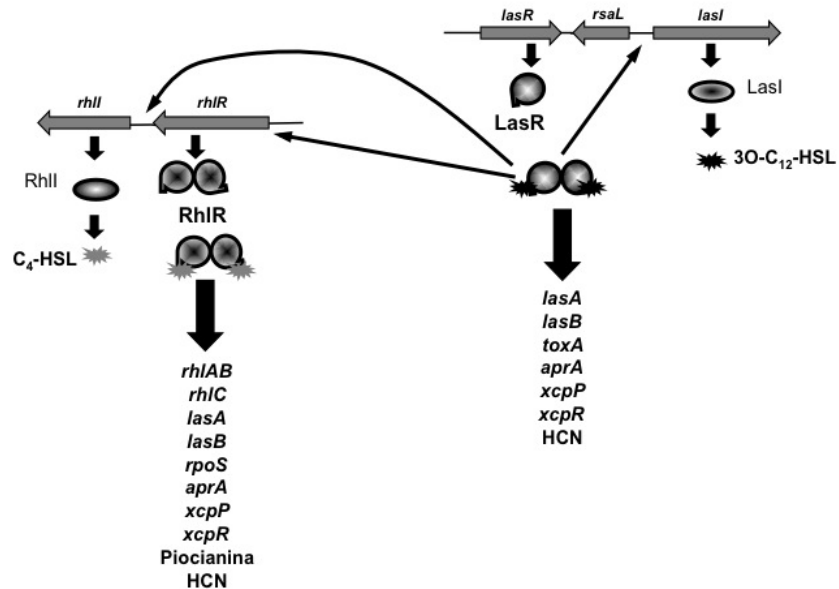


Figura 2. Sistema jerárquico sensor de quórum de *P. aeruginosa*. El esquema muestra la cascada los componente de los regulones *las* y *rhl*. Los genes codifican *lasR*, regulador LasR; *lasI*, 3O-C₁₂-HSL sintasa; *rhlR*, regulador RhIR; *rhlI*, C₄-HSL sintasa; *lasA*, elastasa LasA; *lasB*, elastasa lasB; *toxA*, toxina A; *aprA*, metaloproteasa alcalina; *xcpP*, proteína de secreción XcpP; *xcpR*, proteína E del sistema general de secreción; HCN, cianida de hidrógeno; *rhIA*, sintasa de hidroxialcanoil-hidroxialcanoatos (HAAs); *rhIB*, ramnosil-transferasa I; *rhIC*, ramnosil-transferasa II; *rpoS*, factor sigma 38.

A su vez, la respuesta QS es una red compleja de regulación y está modulada a diferente nivel por diversos factores medioambientales y reguladores globales descritos en la Tabla 1 (Williams y Cámara, 2009). Dichos reguladores pueden interactuar con la cascada de los regulones *las* y/o *rhl* y afectar la producción de FV, la formación de biopelículas y la movilidad.

1.4. Síntesis de dTDP-L-ramnosa, precursor de ramnolípidos y LPS

En *P. aeruginosa*, el azúcar activado precursor de la síntesis de ramnolípidos es la desoxi-timidin-di-fosfo-L-ramnosa (dTDP-L-ramnosa) (Lang y Wullbrandt, 1999; Soberón-Chávez y col., 2005b). Dicho precursor además se requiere para la síntesis del núcleo y el antígeno O del LPS (Rahim y col., 2000; King y col., 2009; Lam y col., 2011).

En la Figura 3 se esquematiza la ruta biosintética de la dTDP-L-ramnosa a partir de glucosa-1-fosfato. RmlA (E.C.2.7.7.24; timidiltransferasa) es la enzima que cataliza la transferencia de un timidilmonofosfato (dTDP) a la glucosa-1-fosfato (Blankenfeldt y col., 2000b). RmlB (E.C.4.2.1.46; dTDP-D-glucosa 4,6 dehidratasa) cataliza la oxidación del grupo hidroxilo del carbono 4 del residuo de la D-glucosa (Allard y col., 2001). La tercer enzima, RmlC (E.C.5.1.3.13; dTDP-4-ceto-6-deoxi-D-glucosa 3,5-epimerasa) cataliza la reacción de epimerización de los carbonos 3 y 5 del anillo 4-ceto-6-desoxi-D-glucosa. Finalmente, RmlD (E.C.1.1.1.133; dTDP-4-ceto-6-desoxi-L-manosa reductasa) reduce el carbono 4 del grupo ceto de la porción 4-ceto-6-desoxi-L-manosa, dando lugar a la formación de dTDP-L-ramnosa (Graninger y col., 1999). Las enzimas biosíntesis de dTDP-L-ramnosa están en el operón *rmlBDAC* (Stevenson y col., 1994; Marolda y Valvano, 1995).

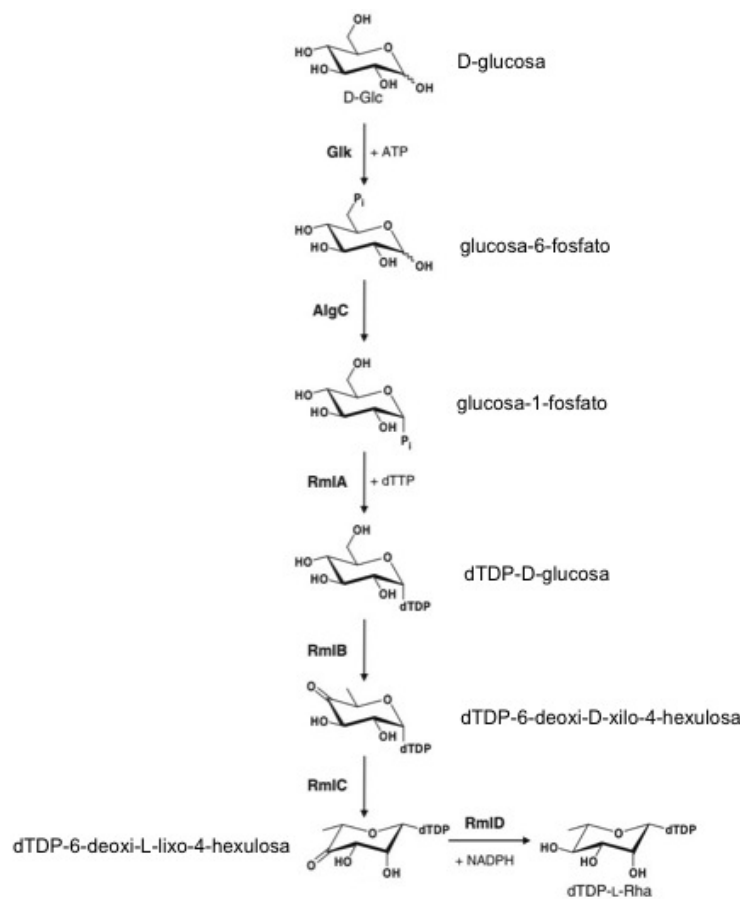


Figura 3. Ruta biosintética de la dTDP-L-ramnosa. Glk, glucocinasa; AlgC, fosfomanomutasa; RmlA, glucosa-1-fosfato timidililtransferasa; RmlB, dTDP-D-glucosa 4,6-dehidratasa; RmlC, dTDP-4-dehidroramnosa 3,5-epimerasa; RmlD, dTDP-4-dehidroramnosa reductasa. Modificada de King y col., 2009.

Los ramnolípidos son compuestos tensioactivos que, además de estar asociados a la virulencia de la bacteria, tienen un uso biotecnológico potencial (Nitschke y col., 2005; Soberón-Chávez y Déziel, 2005). *P. aeruginosa* sintetiza dos familias de ramnolípidos que se caracterizan por el número de residuos de L-ramnosa que contienen (Lang y Wullbrandt, 1999). Los ramnolípidos de *P. aeruginosa* se sintetizan por tres reacciones secuenciales. RhlA cataliza la dimerización de intermediarios de la biosíntesis de ácidos grasos para producir los β-hidroxicanoil-β-hidroxicanoatos (HAAs) (Déziel y col., 2003; Zhu y Rock, 2008); mientras que RhlB (ramnosil transferasa I) transfiere a los HAAs una primer

molécula de ramnosa a partir de la dTDP-L-ramnosa para formar el mono-ramnolípido. Este último es sustrato de RhIC (ramnosil transferasa II) que agrega una segunda molécula de ramnosa, usando también dTDP-L-ramnosa como precursor, y produce el di-ramnolípido (Rahim y col., 2001). El operón *rhlAB* (Ochsner y col., 1994) y el gen *rhlC* (Rahim y col., 2001) codifican las enzimas biosintéticas de los ramnolípidos. Estudios de expresión heteróloga en *E. coli* han demostrado que la dTDP-L-ramnosa es un factor limitante para la producción de ramnolípidos (Cabrera y col., 2006). Además, la expresión de los genes de biosíntesis de mono-ramnolípidos (*rhlAB*) depende del regulador RhIR, involucrado en la respuesta QS (Medina y col., 2003).

Los lipopolisacáridos (LPS) son el principal factor de virulencia de *P. aeruginosa* (Pier, 2007) relacionado con la respuesta inmune innata y adquirida del hospedero. Los LPS son los glucolípidos más representativos de la membrana externa de la bacteria. La L-ramnosa es un componente esencial del núcleo de oligosacáridos del LPS que producen algunas cepas de *P. aeruginosa* (Figura 4) (Rahim y col., 2000; Kocinova y Lam, 2011). El núcleo externo (“outer core”) del LPS se compone de tres tipos de azúcares D-glucosa, L-ramnosa y D-galactosamina; los cuales forman parte de las únicas glicofomas identificadas en *P. aeruginosa*, 1(O-), también llamada desnuda y 2(O+), denominada cubierta porque se continúa por polisacárido O. En la glicofoma 1 la L-ramnosa^A se une de forma (1→6) a la D-glucosa^{II}; mientras que en la glicofoma 2, la L-ramnosa^B se une de forma (1→3) a la D-glucosa^I (Sadouskaya y col., 2000; Bystrova y col., 2006). La ramnosiltransferasa MigA cataliza el enlace L-ramnosa^A (1→6) D-glucosa^{II} y la enzima WapR cataliza el enlace L-ramnosa^B (1→3) D-glucosa^I (Poon y col., 2008). El Esquema de Tipificación Antigénica Internacional (IATS, por sus siglas en inglés) reconoce 20 serotipos distintos de LPS en *P. aeruginosa*, los cuales contienen en su núcleo alguna de las formas glicosiladas 1(O-) o 2(O+) descritas anteriormente (Lam y col., 2011). Además, los genes *migA* y *wapR* también son regulados de manera positiva y negativa, respectivamente, por el sistema RhIR/RhII (Kocíncová y col., 2012).

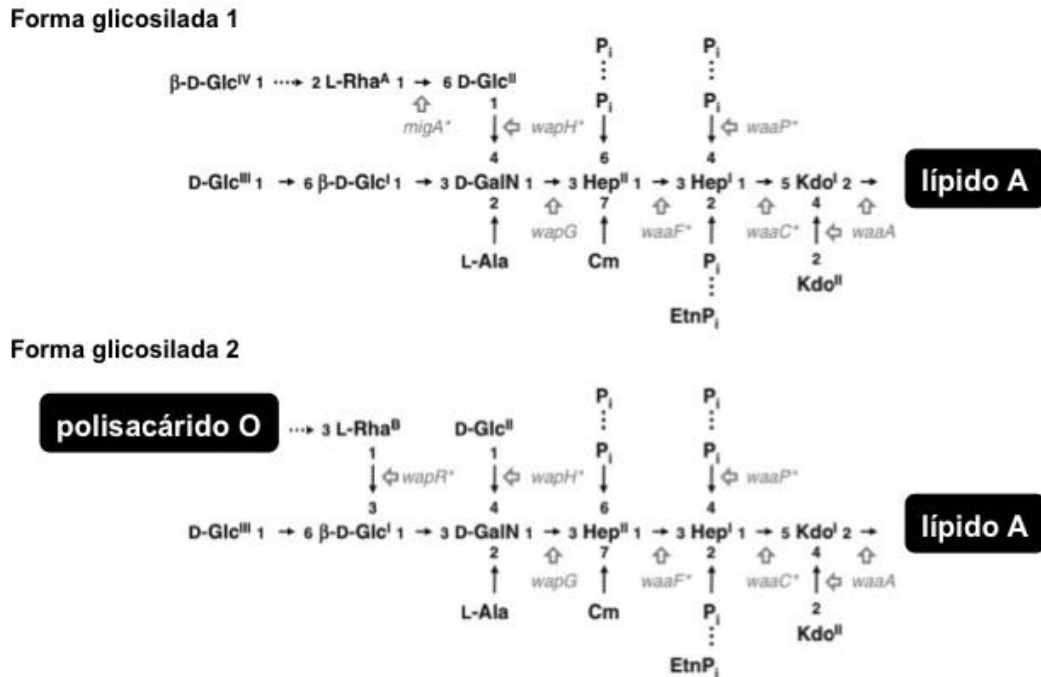


Figura 4. Estructura del “core” del LPS de *P. aeruginosa*. Estructuras de las formas glicosiladas 1 y 2. Los azúcares no señalados presentan una configuración α . Los puntos representan sustituciones no estequiométricas o sustituciones no presentes en todas las cepas. Los genes señalados están relacionados o se sospecha su relación con los eventos enzimáticos de biosíntesis y los asteriscos denotan la existencia de evidencia experimental. *migA*, α -1-6-ramnosiltransferasa; *wapH*; probable glicosiltransferasa de Glc^{II} ; *waaP*, LPS cinasa; *wapG*; probable glicosiltransferasa de GalN; *waaF*; heptosiltransferasa II; *waaC*, heptosiltransferasa I; *waaA*; Kdo transferasa; *wapR*, α -1-3-ramnosiltransferasa. Ala, alanina; Cm, grupo carbamoil; Etn, etanolamina; GalN, 2-amino-2-deoxi-galactosa; Glc, glucosa; Hep, L-glicero-D-mano-heptosa; Kdo, ácido 3-deoxi-D-mano-octo-2-ulosónico; Rha, ramnosa. Modificado de King y col., 2009.

1.5. Regulación dependiente de RhIR y σ^S

El regulador RhIR activa la expresión de los genes diana cuando está unido a C₄-HSL y reconoce a una secuencia de DNA denominada caja *las* (Medina y col. 2003; Soberón-Chávez y col., 2005). Las cajas *las* están conservadas y pueden

ser reconocidas tanto por RhIR como por LasR (Whiteley y Greenberg, 2001), con distinta afinidad y de manera dependiente de la secuencia (De Kievit y col., 2002; Schuster y Greenberg, 2007). LasR interactúa con su secuencia blanco solamente en presencia de 3O-C₁₂-HSL (Kiratisin y col., 2002). RhIR, por el contrario, puede unirse a su secuencia blanco en presencia y ausencia de C₄-HSL y actuar como represor o activador, respectivamente (Medina y col., 2003c). Las cajas *las* (Tabla 2) de los genes regulados por LasR presentan una secuencia consenso 5'NNCTN₂CN₈₋₉AGNN₃' (nucleótidos invariables en negrillas) (Whiteley y col., 1999; Medina y col., 2003a; Gilbert y col., 2009; Croda-García y col., 2011; Wurtzel y col., 2012). Se ha propuesto que los genes regulados por RhIR o por LasR contienen cajas *las* con un consenso 5'NNCTN₃AN₄TN₃AGNN₃' (nucleótidos invariables en negrillas) (Whiteley y Greenberg, 2001; Soberón-Chávez y col., 2005a) u otro consenso propuesto recientemente 5'NNCTNCCN₅TN₃AGNN₃' por Wurtzel y colaboradores (2009). Adicionalmente, Schuster y Greenberg (2007) hicieron un análisis *in silico* de genes regulados directamente por RhIR y reportaron la existencia de cajas *las* con una secuencia atípica 5'N₂CTNCCAGN₂TTNGNAGN₃' (nucleótidos invariables en negrillas) (Tabla 2); sin embargo, no se ha demostrado experimentalmente su funcionalidad.

Tabla 2. Relación de las cajas *las* y los genes regulados por los sistemas *las* y *rhl*.

Gen	caja <i>las</i> ¹	Regulación ²	Referencia
<i>rsaL</i>	AACTAGCAAATGAGAT AGAT	L	De Kievit <i>et al.</i> , 1999
<i>qsc-104</i> (PA2592)	AACTACCAGTTCTGGT AGGT	L	Whiteley <i>et al.</i> , 1999
<i>lasI</i>	AT CT TATCTCATT TGCTAGTT	L	Seed <i>et al.</i> , 1995
<i>lasA</i>	TACTGGAAAAGCTGAT AGTT	L	Toder <i>et al.</i> , 1994
<i>lasB</i> OP2	ACCTGCTTTTCTG-CT AGCT	L	Rust <i>et al.</i> , 1996
<i>rhlR-1</i>	AT CT GCGCGCTTG-AC AGCG	L	Medina <i>et al.</i> , 2003 ^a
<i>rhlR-2</i>	CC CT CGCCCCACGACC AGTT	L	Medina <i>et al.</i> , 2003 ^a
<i>rhlR-3</i>	TG CT GGCATAACAGAT AGGG	L	Croda <i>et al.</i> , 2011
<i>rhlG</i>	AT CT TGTGCATTGCCG CAGTA	L	Campos <i>et al.</i> , 1998
<i>mvfR</i>	CGCTAACAAAAGACAT AGGT	L	Xiao <i>et al.</i> , 2006
PA0572	CAACCAGAACAGAT AG	L	Wurtzel <i>et al.</i> , 2012
PA2384	CTAT CAGATCTGAT GG	L	Wurtzel <i>et al.</i> , 2012
PA2069	CGACCAGATCTGG CAG	L	Wurtzel <i>et al.</i> , 2012
PA1784	CTAT CCGTTCTGG GAG	L	Wurtzel <i>et al.</i> , 2012
PA1221	CTACCA ATTCTCAT AG	L	Wurtzel <i>et al.</i> , 2012

<i>cbpD</i>	CCGT C ACATTTGG TAG	L	Wurtzel <i>et al.</i> , 2012
<i>chiC</i>	CTG C CAATTGTGG TAG	L	Wurtzel <i>et al.</i> , 2012
<i>Irs1 sRNA</i>	CTGTGAGATCTGG GAG	L	Wurtzel <i>et al.</i> , 2012
<i>Irs2 sRNA</i>	CTACCAAAACAGG TAG	L	Wurtzel <i>et al.</i> , 2012
<i>lecA</i>	TCCTGCATGAAT TGGTAGGC	LR	Winzer <i>et al.</i> , 2000
<i>hcnA</i>	ACCTACCAGAAT TGGCAGGG	LR	Pessi y Hass, 2000
<i>rhIA</i>	TCCTGTGAAATCTGG CAGTT	LR	Pearson <i>et al.</i> , 1997
<i>qsc-117(PA1869)</i>	CACTGCCAGATCTGG CAGTT	LR	Whiteley <i>et al.</i> , 1999
<i>lasB OP1</i>	ACCTGCCAGTTCTGG CAGGT	LR	Rust <i>et al.</i> , 1996
<i>rhII</i>	CCCTACCAGATCTGG CAGGT	LR	De Kievit <i>et al.</i> , 2002
<i>phzA1</i>	ACCTACCAGATCT TGTAGTT	LR	Whiteley <i>et al.</i> , 1999
<i>qsc-126(PA3327)</i>	ACCTAACAGATTT GTAAAGTT	LR	Whiteley <i>et al.</i> , 1999
<i>qsc-132(phzS)</i>	CCCTACGCGGCCT TGGAGCC	LR	Whiteley <i>et al.</i> , 1999
<i>rhII S2b</i>	CAAGAATTGATCTGG CAGGT	LR	De Kievit <i>et al.</i> , 2002
<i>vqsR</i>	ACCTACCAGAACTGG TAGTT	LR	Li <i>et al.</i> , 2007
<i>qsc-1028A-13T</i>	ACCTGCCAGGAATGG CAGGT	LR	Whiteley y Greenberg, 2001
<i>phzM</i>	AACTACAAGATCTGG TAGGT	LR	Wurtzel <i>et al.</i> , 2012
<i>rml1</i>	ACCTACCAGATCTGGGG TTG	R	Aguirre-Ramírez <i>et al.</i> , 2012
Propuesta <i>in silico</i>	NNCTNCCAGN TTNGNAGNN	R	Schuster y Greenberg, 2007

¹Las letras resaltadas indican las bases invariables. ²L, se refiere a la activación del gen por LasR/3O-C₁₂-HSL; R, se refiere a la activación por RhIR/C₄-HSL y LR se refiere a la activación por ambos sistemas. Modificada de Soberón-Chávez y col., 2005

El factor sigma alternativo de fase estacionaria (σ^S o σ^{38}) en *P. aeruginosa* participa en la regulación del metabolismo celular para la formación de biopelículas, la resistencia a antibióticos y la virulencia (Fujita y col., 1994; Hong y col., 2005). Asimismo, σ^S afecta la respuesta QS (Whiteley y col., 2000) a través de la regulación de *rhII*. Además, los sistemas *las* y *rhl* presentan una regulación cruzada con RpoS; donde, aproximadamente, el 40% de los genes de ambos regulones se afectan positiva o negativamente por σ^S (Schuster y col., 2004). Particularmente, los genes *rhIA*, *lasB* y el operón *hcnABC* (responsable de la producción de ácido cianhídrico, HCN) se expresan de manera dependiente a σ^S (Schuster y Greenberg, 2007); mientras que *lecA* (lectina I) (Winzer y col., 2000) y *rhIAB* (Medina y col., 2003b) tienen, respectivamente, promotores dependientes o parcialmente dependientes de σ^S .

El mecanismo de regulación y las secuencias consenso de los promotores dependientes de σ^S principalmente han sido descritos en *Escherichia coli* (Hengge-Aronis, 2002; Typas y col., 2007). Además las secuencias de reconocimiento se encuentran altamente conservadas en las Enterobacterias (Chiang y Schellhorn, 2010). Los sitios preferenciales de unión de los factores σ^{70} y σ^S sobre los promotores que regulan se describen en la Figura 5. Para σ^{70} , las secuencias consenso -10 y -35 son similares entre los promotores de *E. coli* (caja -10, TATAAT y caja -35, TTGACA) y *P. aeruginosa* (-10, TAtAAT y caja -35, TTGaCc) (Domínguez-Cuevas y col., 2005). La selectividad de σ^S por sus promotores depende principalmente de: a) una alta tolerancia a variaciones menores de la secuencia consenso en comparación de σ^{70} que es más restrictivo y, b) elementos de reconocimiento alrededor de las secuencias consenso que contra-seleccionan a σ^{70} (Typas y col., 2007).

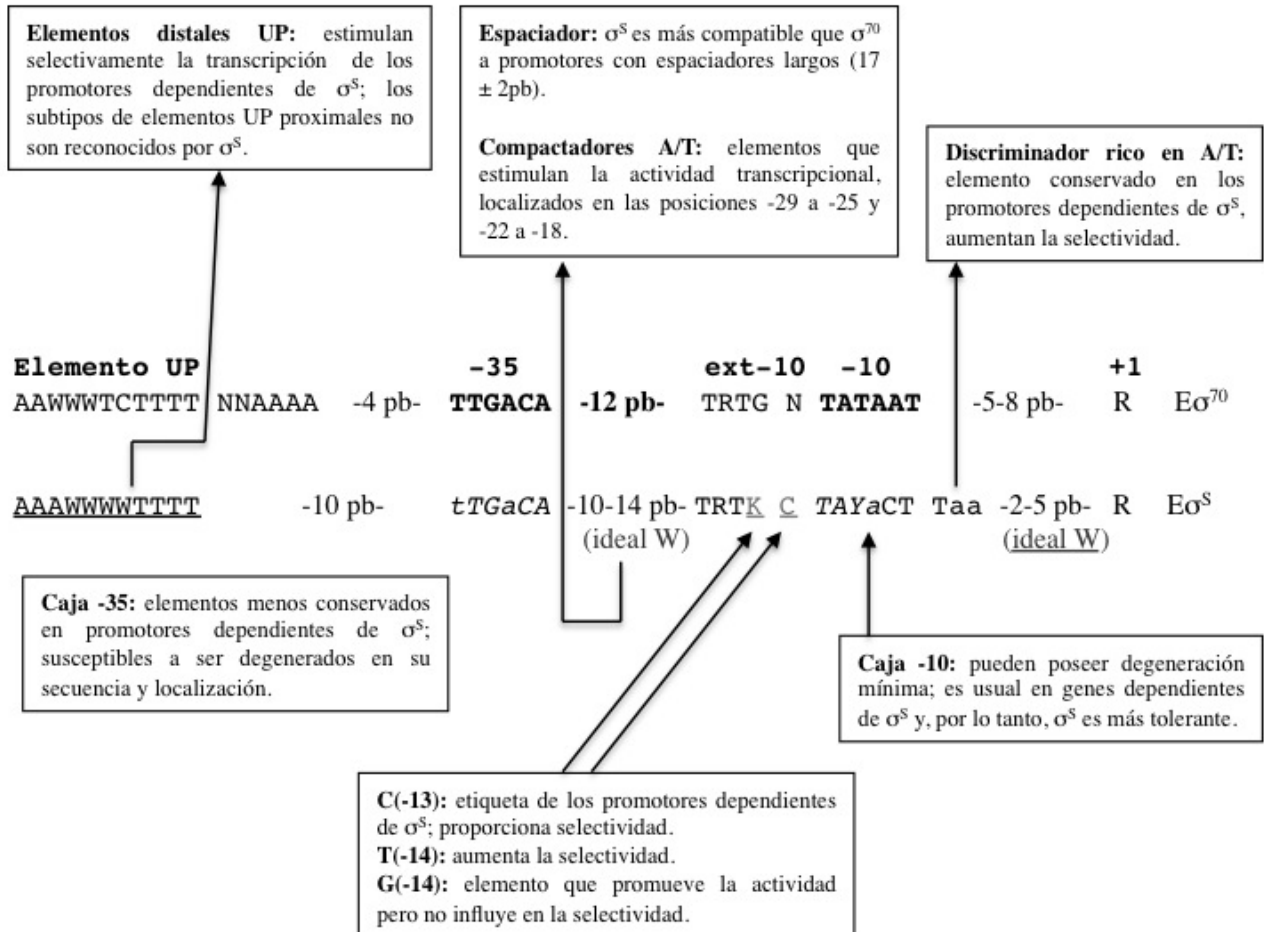


Figura 5. Secuencia consenso para el reconocimiento por σ^{70} y σ^S . En negrillas se señalan las secuencias conservadas en los promotores dependientes de σ^{70} o σ^S . Los elementos de las secuencias -35 y -10 de los promotores dependientes de σ^S están indicados en itálicas (las letras minúsculas corresponden a los nucleótidos menos conservados). Los elementos subrayados, junto con los elementos -10 y -35, contribuyen a la selectividad de σ^S . En las cajas se resumen las funciones más relevantes de cada elemento en los promotores. R, purinas (A/G); Y, pirimidinas (T/C); K, T o G; W, A o T; M, A o C. Modificada de Typas y col., 2007.

2. ANTECEDENTES

Estudios anteriores de nuestro de investigación mostraron que el operón *rmIBDAC* presentaba una expresión basal durante la fase exponencial de crecimiento y que dicha expresión aumentaba cuatro veces durante la fase estacionaria (Olvera, 2000). Los transcritos de *rmIB* en la mutante *rpoS* disminuyeron y la actividad enzimática de RmlC se vio afectada en el fondo genético *rhIR*. Dichos experimentos sugerían una posible regulación dependiente de la respuesta QS sobre el operón *rmIBDAC* (Olvera, 2000). Asimismo, el gen *rmIB* se induce por la respuesta QS en células planctónicas (Schuster y col., 2003) y en biopelículas (Wagner y col., 2003). Sin embargo, no existen otras evidencias experimentales que confirmen la regulación directa por el sistema *rhl* sobre el operón *rmIBDAC*.

Por lo cual, en el presente trabajo estudiamos los mecanismos de regulación del operón *rmIBDAC* por la respuesta QS bajo condiciones de alta y baja producción de ramnolípidos. Se lograron identificar tres promotores, donde el promotor P2 se induce en la fase estacionaria de manera dependiente a RhIR y σ^S . Asimismo, este promotor presenta una caja *las* atípica funcional que es reconocida únicamente por RhIR/C₄-HSL. El trabajo es relevante por ser el primer reporte en donde se identifica una caja *las* atípica, funcional y específica para RhIR/ C₄-HSL.

3. HIPÓTESIS

La expresión del operón *rmIBDAC* en condiciones de alta producción de ramnolípidos depende del sistema *rhl* en *Pseudomonas aeruginosa*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General:

Determinar los mecanismos de regulación del operón *rmIBDAC* en condiciones de alta producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa*.

4.2. Objetivos Particulares:

- Determinar la expresión del operón *rmIBDAC* en medios de alta y baja producción de ramnolípidos (PPGAS y LB, respectivamente) y en los fondos genéticos *rhIR* y *rpoS* a lo largo de la curva de crecimiento.
- Determinar el(los) inicio(s) de transcripción del operón *rmIBDAC*.
- Determinar la funcionalidad de la caja *las* atípica.

5. METODOLOGÍA

5.1. Condiciones de cultivo.

Los experimentos partieron de preinóculos crecidos en medio LB (0.1 % Bacto triptona, 0.5 % extracto de levadura, 1 % NaCl, pH 7.0, Miller, 1992) a 37° C en agitación (225 rpm). Los preinóculos se diluyeron a 0.1 DO_{600nm} en 30 ml de LB o PPGAS (0.02 M NH₄Cl, 0.02 M KCl, 0.12 M Tris/HCl, 0.0016 M MgSO₄, 0.5 % glucosa, 1 % peptona, pH 7.2; Cheng y col., 1970) e incubaron a 30° C ó 37° C en agitación constante. A lo largo de la curva de crecimiento se tomaron muestras para determinar el crecimiento en unidades de densidad óptica y evaluar la expresión a través de la actividad de β-galatosidasa. Las cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 3. Lista de material biológico.

Cepas y plásmidos	Genotipo y fenotipo	Referencia
<i>Cepa</i>		
PAO1	Cepas silvestre de <i>P. aeruginosa</i>	Hancock y Carey, 1979
PAOR1	PAO1 (lasR::Tc)	Gambello e Iglewski, 1991
PAO1 (<i>rhIR</i>)	PAO1(Δ <i>rhIR</i> ::Gm)	Rahimy col., 2001
PAS1	PAO1 (<i>rpoS</i> ::Gm)	Medina y col., 2003b
PAO6359	PAO1 (<i>rpoN</i> ::ΩKm)	Heurlier y col. 2003
PAO1 (<i>rhIR</i> , <i>rpoN</i>)	PAO1(Δ <i>rhIR</i> ::Gm, <i>rpoN</i> ::Km)	Este trabajo
<i>Plásmido</i>		
pLP170	Vector para construcción de fusiones transcripcionales con <i>lacZ</i> , contiene orígenes de replicación para <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> ; Ap ^R	Pearson y col., 1997
pRML-P1	Derivado de pLP170 con la fusión <i>rmIB::lacZ(1)</i> (899 pb) que río arriba contiene un fragmento del gen PA5160, el gen de <i>tRNA</i> completo, la región promotora y una porción codificante de <i>rmIB</i> , Ap ^R	Cabrera-Valladares y col., 2006
pRML-2	Fusión <i>rmIB::lacZ(2)</i> derivada de pRML-P1 que contiene la región promotora completa de <i>rmIB</i> , Ap ^R .	Este trabajo
pRML-3	Fusión <i>rmIB::lacZ(3)</i> derivada de pRML-P1 que contiene parte del promotor <i>rmIB</i> donde se ubica la caja las atípica, Ap ^R .	Este trabajo

pRML-4	Derivado de pUCP18 que contiene el operón completo <i>rrnIBDAC</i> (6.3 kb) regulado por su propio promotor, Ap ^R	Cabrera-Valladares y col., 2006
pRML-P1(AA)	Derivado de pRML-P1 que contiene una sustitución del dinucleótido GC por AA en la posición 3 y 4 de la caja las atípica.	Este trabajo
pRML-P1(CC)	Derivado de pRML-P1 que contiene una mutación (sustitución del dinucleótido AA en las posiciones -89 y -90 por CC) en la secuencia -10 del promotor P2.	Este trabajo
pRML-2(CC)	Derivado de pRML-2 que contiene una mutación (sustitución del dinucleótido AA en las posiciones -151 y -150 por CC) en la secuencia -10 del promotor P3.	Este trabajo

5.2. Cuantificación de la actividad de β-galactosidasa.

La actividad de la enzima β-galactosidasa se determinó de acuerdo al protocolo modificado de Miller (1992). Brevemente, una alícuota (1 ml) del cultivo se centrifugó a 13,000 rpm por un minuto, la pastilla se resuspendió en un volumen de amortiguador Z (0.06 M Na₂HPO₄·7H₂O, 0.04 M NaH₂PO₄·H₂O, 0.01 M KCl, 0.001 M MgSO₄, 0.05 M β-mercaptoetanol, pH 7.0) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. La pastilla se resuspendió, un volúmen de amortiguador Z y se hicieron diluciones de la muestra en un volúmen final de 1 ml del amortiguador Z suplementado con SDS al 0.001 %. A cada dilución se agregaron 10 μl de cloroformo, se mezclaron con vortex e incubaron por 10 min a 28° C. Más tarde, se agregaron 200 μl de ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido, 4 mg/ml), la muestra se agitó con vortex e incubó bajo las mismas condiciones. Se tomó el tiempo hasta que la suspensión se tornó amarillenta y la reacción se detuvo con 500 μl de Na₂CO₃ 1 M. Posteriormente, se determinó la absorbancia de la muestra a DO_{420nm} y DO_{550nm}. Cada dilución se hizo por triplicado. Para calcular la actividad de β-galactosidasa (cantidad de ONPG hidrolizado por minuto por densidad celular) se empleó la ecuación de Miller:

$$\text{Unidades Miller} = \frac{1000 [DO_{420} - (DO_{550} \times 1.75)]}{t \times v \times DO_{600}}$$

t = tiempo de reacción (min).

v = volúmen de la dilución (ml).

5.3. Manipulación de ácidos nucleicos y amplificaciones.

La manipulación de los ácidos nucleicos y técnicas de clonación se basaron en los protocolos descritos por Sambrook y col., 1989. Los oligonucleótidos empleados para la construcción de fusiones transcripcionales, secuenciación y mutagénesis dirigida se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este estudio.

Oligonucleótido	Secuencia (5'–3')
rmIB62	CGCCCGCGGCTGGTACCCGGCG
rmIBc	CACTTCGAATAGAATTCCGGGTCA
rmIBm	TGTCGCAAGCTTCGCCGGTATAG
rmIB+87	ACCACCGGCTCGTCATGCAG
lacZr	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACG
lasIIAA	GGTCAGATGCACAAACCAGATCTGGG
lasIIAA-r	CCCAGATCTGGTTTGTGCATCTGACC
P210CC	CCATTTTTCCCGTACTCCTCGTCGTCTTCACG
P210CC-r	CGTGAAGACGACGAGGAGTACGGGAAAAATGG
P310CC	GGCACTTCGAATACCATGCCGGGTTCAGATGC
P310CC-r	GCATCTGACCCGGCATGGTATTTCGAAGTGCC

Las reacciones de amplificación para las fusiones *rmIB::lacZ(2)* (392 pb) y *rmIB::lacZ(3)* (551 pb) se emplearon las parejas de oligos rmIBc-rmIB62 (10 μ M) y rmIBm-rmIB62 (10 μ M), respectivamente. Las amplificaciones se hicieron con la enzima Taq Pol (5 U/ μ l, PROMEGA) y a partir del DNA plásmido pRML-4 (100 ng/ml) (Tabla 3). Las reacciones de amplificación se corrieron con el programa 94 $^{\circ}$ C por 5 min, 94 $^{\circ}$ C por 45 s, 60 $^{\circ}$ C por 45 s, 72 $^{\circ}$ C por 1 min por 35 ciclos y 72 $^{\circ}$ C por 10 min finales.

5.4. Construcción de las fusiones transcripcionales *rmIB::lacZ*.

Para la construcción de las fusiones transcripcionales *rmIB::lacZ(2)* y *rmIB::lacZ(3)*, clonadas en los plásmidos pRML-2 y pRML-3 (Tabla 3)

respectivamente, los amplicones de 392 pb y 551 pb se purificaron a partir de geles de agarosa 1% en TAE 1X (solución 10X, 0.4 M Tris-acetato, 0.010 M EDTA, pH 8.2, 120 volts) con el kit QIAquick (QIAGEN) para productos de PCR. Ambos fragmentos se digirieron con los cocteles enzimáticos *EcoRI/XhoI* y *HindIII/KpnI* (PROMEGA) respectivamente y se clonaron en el vector de expresión pLP170 con la T4 ligasa HC (Invitrogen). Todas las construcciones fueron comprobadas por secuenciación usando el oligo lacZr (Tabla 4) en las unidades de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM y de la Universidad de Texas en El Paso.

5.5. Transformación bacteriana.

Para preparar las células competentes, las distintas cepas de *P. aeruginosa* se crecieron en medio LB a 37° C con agitación hasta 0.2 de DO_{600nm}. Los cultivos se enfriaron por 10 min a 4° C y se centrifugaron 5,800 rpm por 10 min en un rotor SS-34 para Sorvall. Las células se lavaron dos veces con 0.5 vol de MgCl₂ 150 mM frío y se volvió a centrifugar. Finalmente se concentraron en 1/50 de volumen de una solución MgCl₂ 150 mM más glicerol 15%.

Se tomaron 20 µl de células competentes y se les agregaron hasta 100 ng de DNA ó 5 µl de reacción de ligación e incubaron en hielo por 1 h. Más tarde, se dio un choque de calor a 37° C por 3 min y se incubaron nuevamente en hielo por 5 min más. Se agregó 1 ml de LB a las células e incubaron con agitación a 37° C por 2 h. Las células se centrifugaron a 13,000 rpm por 2 min y la pastilla se resuspendió en 100 µl de medio LB. Finalmente, las células se sembraron en cajas de medio LB (1.5 % agar) con ampicilina (200 µg/ml).

5.6. Búsqueda de inicios de transcripción.

Los inicios de transcripción se identificaron por la técnica de extensión de primero (“primer extension”). Los transcritos de las distintas cepas se purificaron con el kit

RNesay (QIAGEN) de acuerdo al protocolo para bacterias Gram-negativas. El oligo fue marcado con [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP [3000 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Science] usando la T4 polinucleótido cinasa (Amersham GE Life Science). La reacción de RT-PCR se llevó a cabo usando el oligo rmlB+87 (Tabla 4) y la transcriptasa reversa SuperScrip III (200 U/ μl , Invitrogen) a 55°C. La reacción de secuencia se llevó a cabo con el kit “fmol DNA Cycle Sequencing System” (Promega) usando como templado el plásmido pRML-4 y el oligo rmlB+87. Los geles de 10% de poliacrilamida y 42 % de urea se corrieron a 35 watts por 12 h.

5.7. Mutagénesis dirigida.

Las mutaciones puntuales de los plásmidos pRML-P1(AA), pRML-P1(CC), y pRML-2(CC) se construyeron usando el kit de mutagénesis sitio dirigida QuikChange II XL (Stratagene) y las parejas de oligos lasIIAA/lasIIAAr, P210CC/P210CCr y P310CC/P310CCr (Tabla 4), respectivamente. Las mutaciones se comprobaron por secuenciación con el oligo lacZr.

5.8. Transducción de la mutación *rpoN*.

La construcción de la cepa PAO1(*rhIR, rpoN*) se llevó a cabo usando el fago E79 tv-2 de acuerdo al método de Morgan (1979). La cepa donadora PAO1(*rhIR*) se creció en 20 ml de medio LB a 37° C, 225 rpm por 18 h. La propagación se hizo colocando 1 vol del bacteriófago (1×10^9 UFP/ml) más 1 vol de células (1×10^8 UFC/ml) en presencia de CaCl_2 10 mM. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 min y se agregó a 3 ml de LB agar (0.8 %) lo cual se vació sobre cajas de LB agar (1.5 %) e incubó a 37° C por 16 h. Más tarde se agregó a la superficie de la caja 4 ml de amortiguador TMN (0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl_2 , 0.1 M Tris-HCl, 0.05 % Tween 20, pH 7.5) y se raspó la superficie para recuperar la capa de agar suave con los fagos. El raspado se mezcló y centrifugó a 4500 rpm por 15 min y se recuperó el sobrenadante, se agregaron además 300 μl de cloroformo y se almacenó a 4° C.

La transducción del fago E79 tv-2(*rhIR*) se hizo mezclando distintos volúmenes del fago a una concentración de 1×10^9 UFP/ml con $100 \mu\text{l}$ (5×10^8 UFC/ml) de células de la cepa receptora PAO6359. La incubación se hizo en presencia de CaCl_2 10 mM por 15 min sin agitación a 37°C . Dicha mezcla se lavó dos veces con 1 ml de amortiguador TMN y plateó en cajas de LB suplementadas con kanamicina (75 $\mu\text{g/ml}$) y gentamicina (200 $\mu\text{g/ml}$).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. La expresión del operón *rmIBDAC* depende de RhIR y σ^S .

Para explorar el promotor del operón *rmIBDAC* se hizo un análisis *in silico* de la región intergénica (384 pb) de los genes PA5160 y *rmIB* del genoma de PAO1 (Dr. Ramírez-Romero, Centro de Ciencias Genómicas, UNAM). En la Figura 6 se muestran las diversas secuencias regulatorias putativas que presentaron valores de probabilidad altos (“score”). Dichas secuencias corresponden a consensos para los reguladores NarL, FleQ, RhIR o LasR (caja *las* I, caja *las* II atípica y caja *las* III). Así como las secuencias promotoras y codificantes de un *tRNA* y otros posibles promotores.

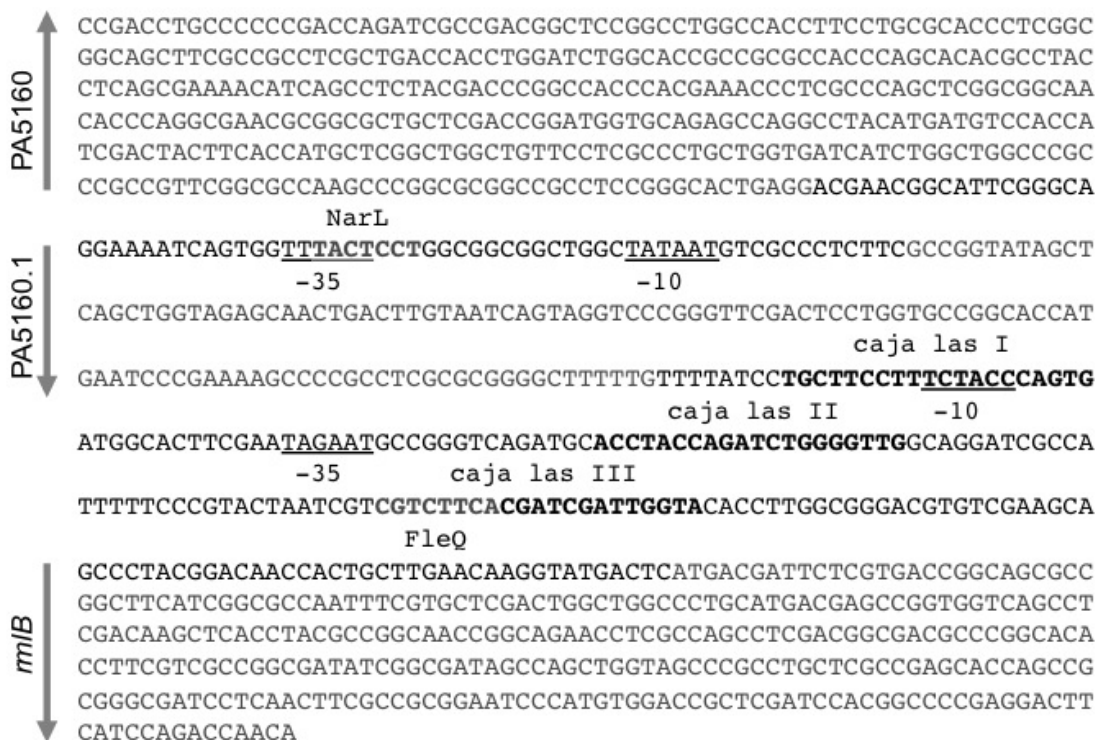


Figura 6. Secuencia intergénica entre PA5160 y *rmIB*. Las secuencias codificantes y la dirección de los genes se señalan en gris claro. Las letras subrayadas indican las cajas -10 y -35 putativas. Las cajas *las* putativas se indican en negrillas y en gris oscuro se señalan las cajas de otros posibles reguladores. La secuencia se obtuvo de la base de datos <http://www.pseudomonas.com>.

Tales elementos regulatorios podrían participar en la regulación de la expresión del gen *rmIB*; por lo que clonamos distintas fusiones transcripcionales (Figura 7) y cuantificamos su expresión en diferentes fondos genéticos, a través de la actividad de β -galactosidasa.

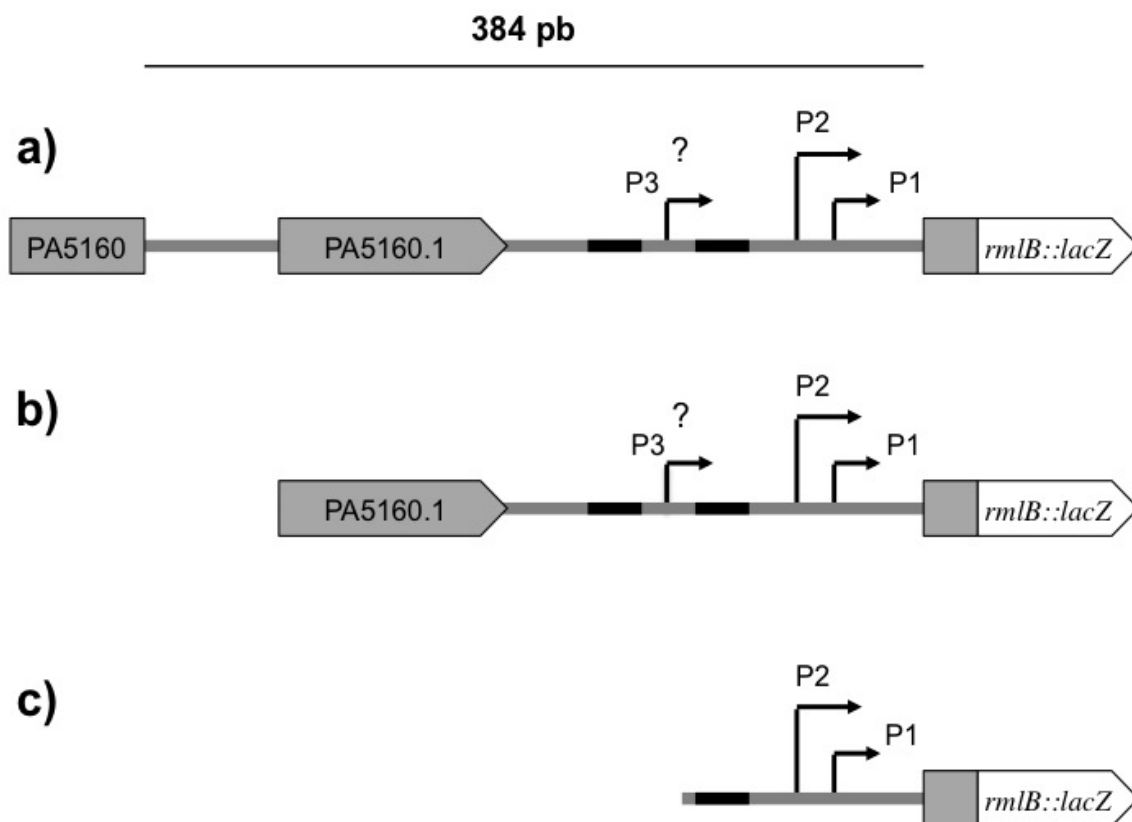


Figura 7. Fusiones transcripcionales *rmIB::lacZ*. a) Fusión *rmIB::lacZ(1)* presente en el plásmido pRMLP-1; b) fusión *rmIB::lacZ(2)* presente en el plásmido pRML-2; c) fusión *rmIB::lacZ(3)* presente en el plásmido pRML-3 (Tabla 3). Los inicios de transcripción se indican con flechas negras. Los inicios P1 y P2 se identificaron por “primer extensión” (Figura 9) y el inicio P3 putativo se asume por los datos de actividad presentados en la Figura 12. La posición de las cajas *las* se señala en líneas negras.

Se sabe que la producción de ramnolípidos aumenta en la fase estacionaria (Zhang y Miller, 1994; Dekimpe y Déziel, 2009). Esta producción depende directamente del aumento en la expresión de *rhIR* (Medina y col., 2003c; Ochsner

y col., 1994), *rhIAB* (Ochsner y col., 1994) y *rhIC* (Rahim y col., 2001). Es probable que un aumento en la expresión del operón *rmIBDAC* pudiera contribuir, además, en la inducción de la síntesis de ramnolípidos (Olvera, 1994). Por tal motivo, decidimos evaluar la expresión de las distintas fusiones en medio PPGAS (Cheng y col., 1970), el cual es bajo en fosfatos y favorece dicho aumento (Zhang y Miller, 1994).

Las fusiones transcripcionales *rmIB::lacZ(1)*, *rmIB::lacZ(2)* y *rmIB::lacZ(3)* mostraron una expresión constitutiva durante la fase exponencial de crecimiento (Figura 8a,b, y c) en el fondo genético de la cepa silvestre. Todas las fusiones aumentaron su expresión hasta tres veces los niveles basales a las 10 h de cultivo; dichos niveles se mantuvieron altos a tiempos largos de la fase estacionaria. La fusión *rmIB::lacZ(2)* se contruyó debido a que los resultados de Olvera (2000) indicaban que el inicio de transcripción se encontraba en la región promotoral del gen PA5160.1, el cual no se había identificado entonces. Sin embargo, las fusiones *rmIB::lacZ(1)* y la fusión *rmIB::lacZ(2)* presentaron un patrón similar de expresión entre sí en los fondos genético silvestre y *rhIR*. Esto indica que la expresión del gen PA5160.1 no afecta la regulación del operón *rmIBDAC*. De manera independiente, la fusión *rmIB::lacZ(3)* presentó una expresión diez veces menor en sus niveles basales y en su inducción durante al fase estacionaria comparado con las dos fusiones mencionadas anteriormente. Los datos sugieren que todos los elementos regulatorios del gen *rmIB* se encuentran río abajo de la base -196, justo donde termina el gen *tRNA-Thr* (PA5160.1). Adicionalmente se puede concluir que algunos de los elementos regulatorios necesarios para la inducción durante al fase estacionaria se conservan en al fusión *rmIB::lacZ(3)* y son dependientes de *RhIR* (ver más adelante).

En el fondo genético *rhIR* la inducción de la expresión de todas las fusiones durante la fase estacionaria se vió afectada; no así la expresión basal. Por lo tanto, los datos sugieren que el operón *rmIBDAC* podría estar regulado positivamente por *RhIR/C₄-HSL* durante la fase estacionaria. Asimismo, el

aumento de la actividad transcripcional de la fusiones estudiadas se podría correlacionar con la inducción de la síntesis de ramnolípidos al inicio de la fase estacionaria (Dekimpe y Déziel, 2009), mientras que la expresión basal coincide con la producción de LPS a lo largo de la curva de crecimiento.

A través de ensayos de “primer extension”, se determinaron dos inicios de transcripción (Figura 9a) del operón *rmIBDAC*. El promotor P1 corresponde al sitio de inicio de la transcripción localizado en la base -28 a partir del inicio de traducción y presenta secuencias consenso de reconocimiento para σ^{54} (5'-**GGACGTGTCGAAGC**_{3'}, los sitios -12 y -24 se indican en negrillas), ubicadas 12 pb río arriba de P1 (Figura 9b). El transcrito a partir de P1 se expresa en las fases exponencial (0.6 DO_{600nm}) y estacionaria (1.5 DO_{600nm}) de crecimiento y fue detectado en los fondos genéticos PAO1(*rhIR*) y PAO1(*rpoS*). Por lo tanto su expresión es independiente de los reguladores RhIR y σ^S . Es probable que el promotor P1 sea responsable de la expresión basal en todas las fusiones (Figura 8); la misma que no se afecta por los reguladores RhIR y σ^S (Figura 8a). La regulación directa de σ^{54} sobre la expresión del gen *rmIB* se evaluó a través de la actividad transcripcional de la fusión *rmIB::lacZ(1)* en los fondos genéticos *rpoN* y *rhIR rpoN* (Figura 10). Sin embargo, bajo las condiciones estudiadas no se detectó efecto alguno sobre dicha expresión basal y la inducción del operón *rmIBDAC* en la fase estacionaria.

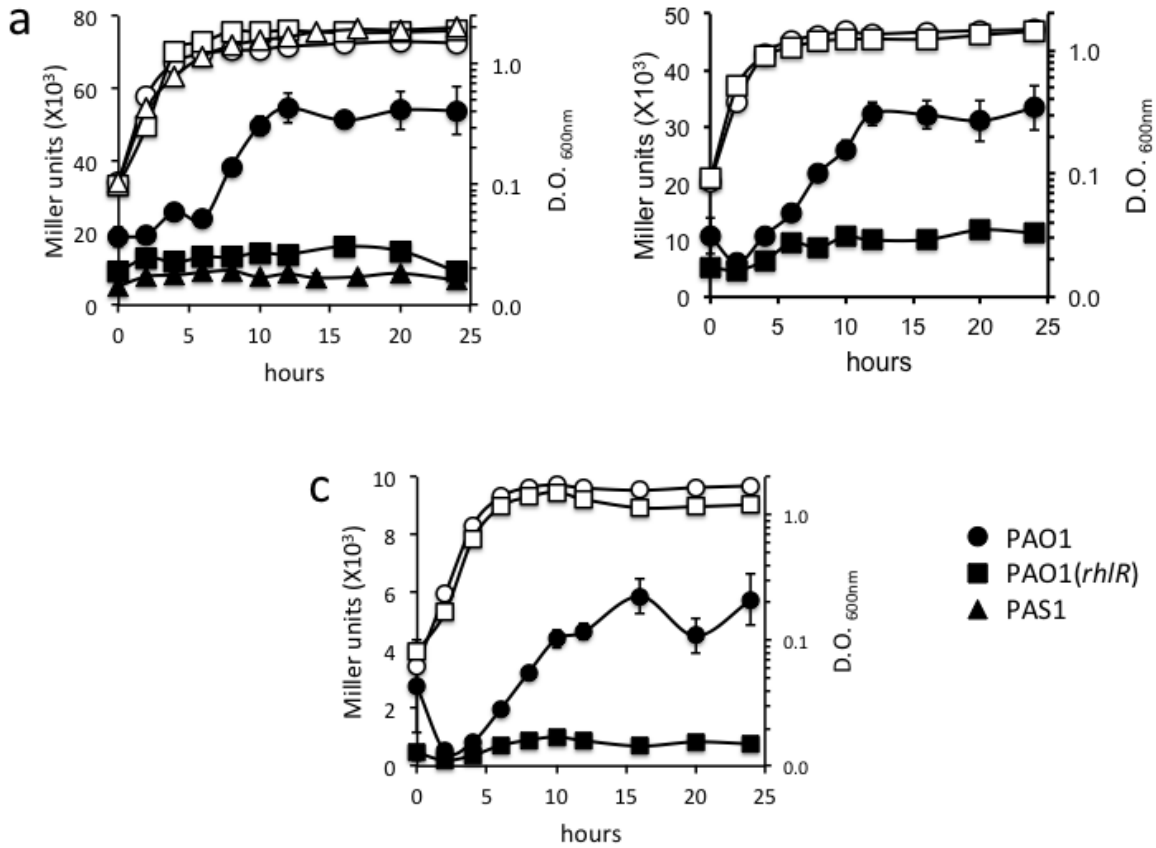


Figura 8. Expresión de las fusión *rmlB::lacZ* en distintos fondos genéticos. a) Fusión *rmlB::lacZ(1)* clonada en el plásmido pRMLP-1; b) fusión *rmlB::lacZ(2)* clonada en el plásmido pRML-2; c) fusión *rmlB::lacZ(3)* clonada en el plásmido pRML-3. Los fondos genéticos que indican los símbolos se describen en la Tabla 3. Actividad de β -galatosidasa en símbolos cerrados; crecimiento en símbolos abiertos. Los resultados son el promedio de al menos tres experimentos independientes.

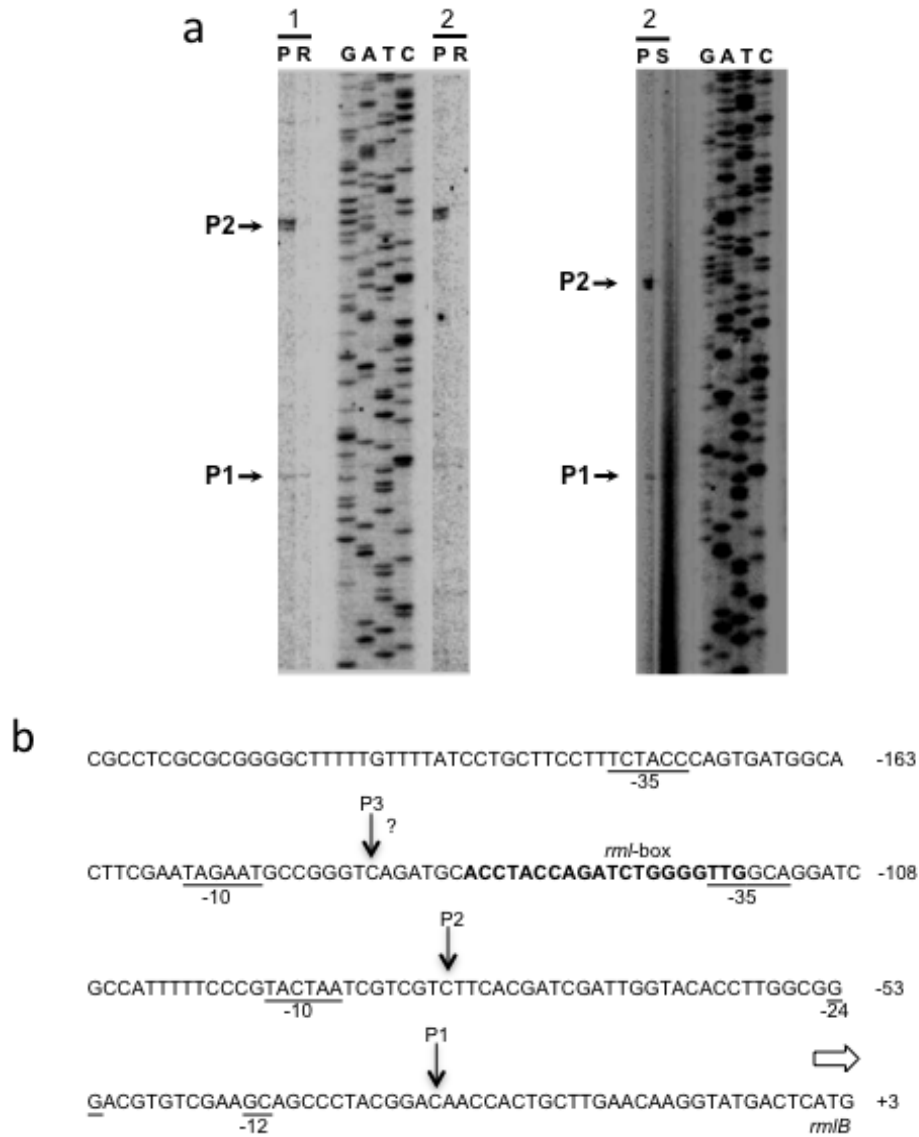


Figura 9. Caracterización de la región promotora del operón *rmlBDAC*. a) Identificación de los sitios de inicio de transcripción por ensayos de “primer extension” en los fondos genéticos de PAO1 (P), *rhIR* (R) y *rpoS* (S). Carriles 1, muestras de RNA tomadas en la fase exponencial (0.6 DO_{600nm}); carriles 2, muestras de RNA tomadas en la fase estacionaria (1.5 DO_{600nm}). Los carriles G, A, T, C indican la secuencia de referencia. b) Representación de la región promotora del operón *rmlBDAC*. Los inicios de transcripción (P1, P2 y P3) se indican con flechas negras; los sitios de reconocimiento de la RNA polimerasa (-10 y -35 o -12 y -24) se subrayaron; la caja *las* atípica se indica en negrilla. El sitio de inicio del promotor P3 no fue detectado por “primer extension” por lo que es señalado con un signo de interrogación.

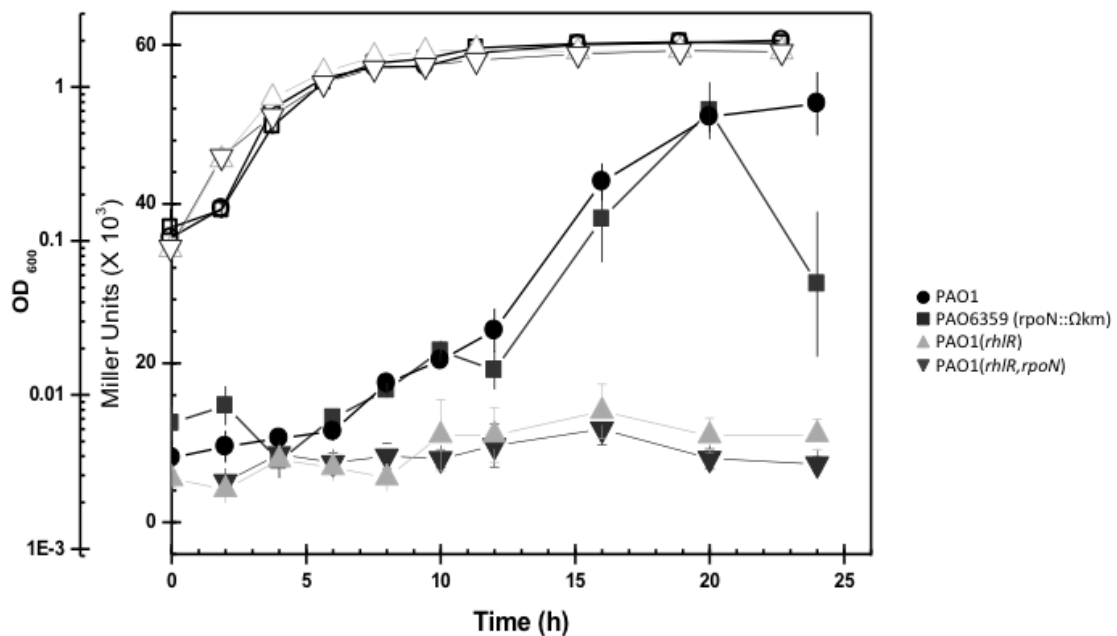


Figura 10. Efecto de *rpoN* sobre la expresión del operón *rmlBDAC*. Los símbolos cerrados señalan la actividad de β -galactosidasa, los símbolos abiertos indican el crecimiento. Los fondos genéticos que indican los símbolos se describen en la Tabla 3. Los resultados son el promedio de al menos tres experimentos independientes.

El promotor P2 se localiza en la base -80 pb a partir del inicio de traducción (Figura 9b) y contiene una caja -10 ($5'$ TACTAA $3'$) a 7 pb río arriba, separada por 18 pb de la caja -35 ($5'$ TTGGCA $3'$). El transcrito que inicia en P2 no fue detectado por “primer extension” en los fondos genéticos *rhIR*⁻ y *rpoS*⁻ (Figura 9a), lo cual sugiere una regulación positiva por las proteínas codificadas por ambos genes. Las secuencias putativas -35 y -10 propuestas para el promotor P2 cumplen con otros elementos consenso de reconocimiento para σ^S (Figura 5) que transcribe preferencialmente promotores con cajas -10 y -35 especiadas por 17 pb \pm 2 pb (Figura 5) (Typas y col., 2007), lo que sugieren un a regulación directa.

A través mutagénesis dirigida sustituimos las bases AA por CC de la caja -10 del P2 en la fusión *rmlB::lacZ(1)* y evaluamos su actividad transcripcional (Figura 11). La mutación mencionada provocó la pérdida de la inducción en la fase

estacionaria; incluso los niveles de expresión de la mutante resultaron por debajo de los niveles basales observados en el fondo genético *rhIR*. Los datos anteriores indican que el promotor P2 es el mayor responsable de la inducción del operón *rmIBDAC* durante la fase estacionaria (Figuras 8 y 9a) y su expresión depende parcialmente de RhIR y σ^S . Sin embargo, debido a que los niveles de expresión de la mutante en la caja -10 del promotor P2 se encuentran por debajo de la expresión basal observada en las mutantes *rhIR* y *rpoS*, concluimos que este promotor además de inducirse por el regulador transcripcional RhIR y por la RNA polimerasa con el factor σ^S , tiene una expresión constitutiva por la RNA polimerasa con el factor σ^{70} que es la que contribuye a la mayor parte de la expresión basal de este promotor (Figura 11).

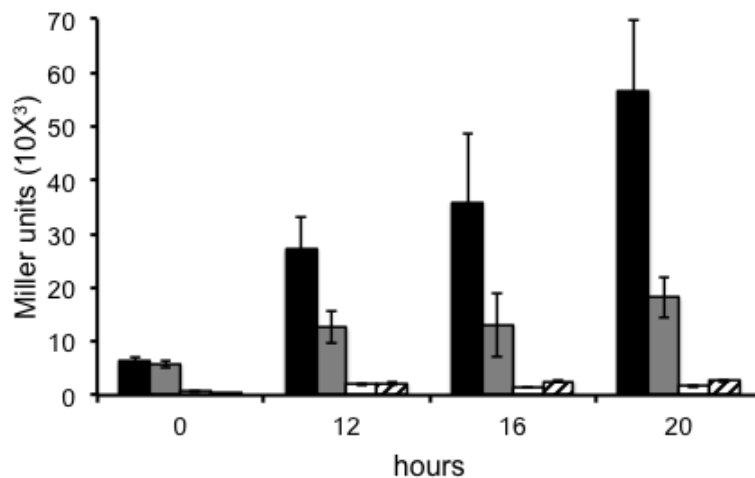


Figura 11. Expresión de las mutantes en la caja -10 del promotor P2 y la caja *las* atípica del operón *rmIBDAC*. Expresión del plásmidos pRML-P1 y sus mutantes derivadas pRML-P1(AA) (en la caja *las* atípica) y pRML-P1(CC) (en la secuencia -10 del promotor P2) (Tabla 3) a diferentes tiempo del crecimiento. Barras negras, expresión del plásmido pRML-P1 en el fondo de la cepa PAO1; barras grises y blancas, expresión del plásmidos pRML-P1(AA) en los fondos de las cepa silvestre y PAO1(*rhIR*); barras rayadas, expresión del plásmidos pRML-P1(CC) en la cepa silvestre. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes.

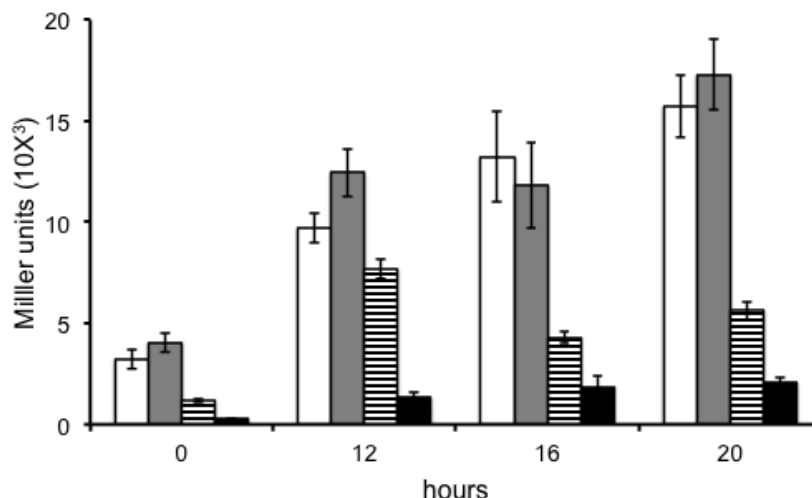


Figura 12. Expresión de la mutante -10 del promotor P3 en el fondo genético *rhIR*. La expresión del plásmido pRML-2 (barras blancas y rayadas) y su mutante derivada pRML-2(CC) (barras gises y negras) en los fondos genético de las cepas PAO1 y PAO1(*rhIR*) (Tabla 3), respectivamente. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes.

El análisis *in silico* mostró un promotor putativo (P3) que se localiza 140 pb río arriba del inicio de traducción. Éste contiene secuencias -10 (5'TAGAAT_{3'}) y -35 (5'TCTACC_{3'}) separadas por 18 pb (Figura 6). Para evaluar si dicho promotor es funcional, mutamos los nucleótidos AA por CC de la caja -10 en la fusión *rmIB::lacZ(2)* y cuantificamos su actividad transcripcional en los fondos genéticos silvestre y *rhIR* (Figura 12). El efecto de la mutación sobre la caja -10 del promotor P3 solo fue evidente en ausencia de RhIR. Es posible que RhIR pudiera estar jugando un papel represor sobre el promotor P3 en la cepa silvestre a través de la caja *las I* (Figura 6), de manera semejante a la regulación del operón *rhIAB* (Medina y col., 2003c). Sin embargo, en ninguno de los ensayos de “primer extension” se pudo determinar su inicio de transcripción, aún en ausencia de *rhIR*. Por lo tanto, los promotores P3 y P1 pudieran estar relacionados con la expresión basal del operón *rmIBDAC* necesaria para la producción de dTDP-L-ramnosa que garantice la síntesis de LPS de manera independiente a RhIR; aunque como se mencionó, esta expresión basal parece provenir en su mayoría del promotor P2 (Figura 11).

6.2. La caja *las* atípica es funcional.

A través del análisis *in silico*, se identificó una caja *las* II atípica $5'ACCTACCA**GATCTGGGGTTG**3'$ (Figura 6) (en negrillas se señalan los sitios de coincidencia con los consensos para cajas reconocidas por RhIR propuestos por Schuster y Greenberg, 2007 y en cursiva los propuestos por Wurtzel y col. 2012 para). Esta caja se ubica en la 44.5 pb río arriba del inicio del promotor P2. Para demostrar su funcionalidad, por mutagénesis dirigida, sustituimos las bases CT por AA de las posiciones 3 y 4, en la secuencia en la fusión *rmIB::lacZ(1)*. La expresión de la mutante disminuyó en el fondo genético de la cepa silvestre y de manera dramática en el fondo *rhIR* (Figura 11). Los datos indican, entonces que la caja *las* atípica es funcional.

Es posible que la caja *las* I (Figura 6), identificada *in silico*, sea funcional, debido a que contiene los elementos que LasR reconoce típicamente ($5'TG**C**TT**C**TTTCTACCC**AGT**G3'$, las negrillas indican las bases consenso) (Gilbert y col., 2009). Existen evidencias sobre genes que presentan promotores con múltiples cajas *las* específicas para LasR (Gilbert y col., 2009 y Wurtzel y col., 2012). El arreglo genético del operón *rmIBDAC* analizado *in silico* nos sugiere un promotor con múltiples cajas *las*; sin embargo, esto no fue abordado experimentalmente.

Para demostrar que la caja *las* II atípica se regula directamente por RhIR, se hicieron ensayos de expresión heteróloga en *E. coli* con la fusión *rmIB::lacZ(3)* (Figura 3, Anexo I, Aguirre-Ramírez y col., 2012). Dicha construcción sólo se indujo en presencia de la proteína RhIR y C₄-HSL. LasR no tuvo efecto sobre su expresión aún cuando el medio fue suplementado con 3O-C₁₂-HSL. Los datos sugieren que RhIR es el regulador responsable de la inducción del promotor P2 y que dicha activación es dependiente de C₄-HSL.

Adicionalmente, se hizo una construcción artificial cromosomal en *E. coli*, que contenía a la caja *las* II atípica flanqueada por las secuencias -10 (5'TATAAT_{3'}) y -35 (5'TTGACA_{3'}) consenso de los promotores transcritos por la RNA plimerasa que tiene el factor σ^{70} y fusionada al gen reportero *lacZ* (Tabla 2, Anexo I, Aguirre-Ramírez y col., 2012). Esta fusión se expresó de manera constitutiva y fue reprimida al cincuenta porciento en presencia de RhIR o RhIR-C₄-HSL. En condiciones de sobreexpresión de LasR y aún en presencia de 3O-C₁₂-HSL no se observó efecto alguno. Por lo tanto, la caja *las* atípica es reconocida específicamente por RhIR y RhIR/C₄-HSL. Este es el primer trabajo que demuestra la existencia de una secuencia de reconocimiento específica para RhIR que no une de manera detectable al complejo LasR/3O-C₁₂-HSL.

El análisis *in silico* mostró un promotor putativo (P3) que se localiza 140 pb río arriba del inicio de traducción. Éste contiene secuencias -10 (5'TAGAAT_{3'}) y -35 (5'TCTACC_{3'}) separadas por 18 pb (Figura 6). Para evaluar si dicho promotor es funcional, mutamos los nucleótidos AA por CC de la caja -10 en la fusión *rmIB::lacZ(2)* y cuantificamos su actividad transcripcional en los fondos genéticos silvestre y *rhIR* (Figura 12). El efecto de la mutación sobre la caja -10 del promotor P3 solo fue evidente en ausencia de RhIR. Es posible que RhIR pudiera estar jugando un papel represor sobre el promotor P3 en la cepa silvestre a través de las cajas *las* I (Figura 6), de manera semejante a la regulación negativa del operón *rhIAB* (Medina y col., 2003c). Sin embargo, en ninguno de los ensayos de “primer extension” se pudo determinar su inicio de transcripción; aún en ausencia de *rhIR*. Por lo tanto, los promotores P3 y P1 estarían más relacionados con la expresión basal del operón *rmIBDAC* necesaria para la producción de dTDP-L-ramnosa que garantice la síntesis de LPS de manera independiente a RhIR.

6.3. La inducción del operón *rmIBDAC* es independiente del medio de cultivo y la temperatura.

Adicionalmente, evaluamos la expresión del operón *rmIBDAC* bajo distintas condiciones de cultivo. En medio PPGAS a 30° C (Figura 13a), de alta producción de ramnolípidos no se observó la inducción de la expresión durante la fase estacionaria detectada a 37° C (Figura 13b); además, los niveles de actividad transcripcional fueron semejantes en las cepas silvestre y PAO1(*rhIR*). En el fondo genético *rpoS*⁻, la expresión se redujo 0.5 veces y tampoco se observó inducción a tiempos largo de la fase estacionaria. Datos generados por el grupo de trabajo de la Dra. Soberón sugieren que la inducción de la expresión del operón *rmIBDAC*, y otros genes regulados por RhIR, se origina por un aumento en la producción de RhIR a 37° C. Dicho aumento se debe a una regulación postranscripcional (datos no mostrados, comunicación personal Victoria Grosso-Becerra) del transcrito policistrónico *rhIABR* (Croda-García y col. 2011). El aumento de RhIR induciría además la expresión de los genes biosintéticos de ramnolípidos durante la fase estacionaria (operón *rhIAB*) y, en consecuencia, la producción de ramnolípidos (Ochser y col., 1994; Medina y col., 2003b).

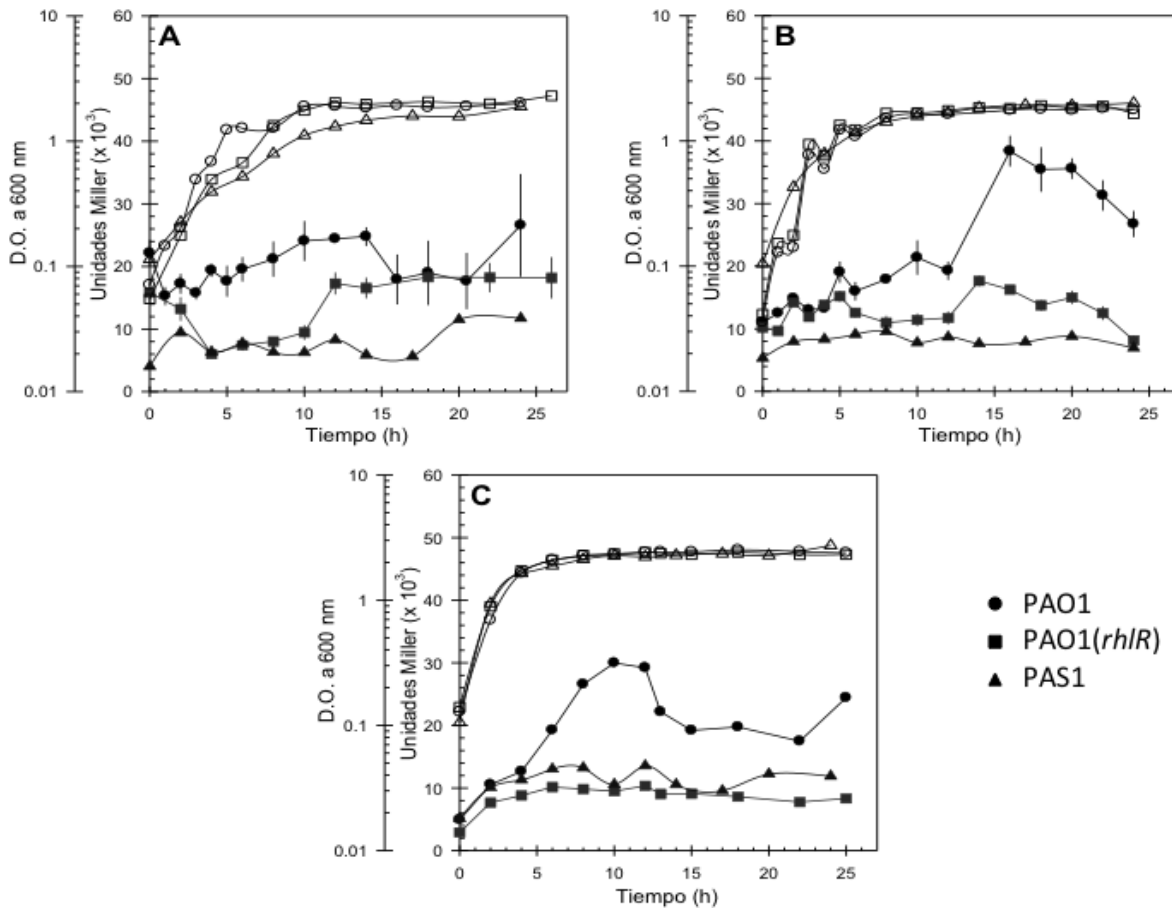


Figura 13. Actividad transcripcional de la fusión *rmIB::lacZ(1)* en distintas condiciones de cultivo. Las cepas se crecieron en medio PPGAS a 30° C (a) y 37° C (b) y medio LB a 37° C (c). Los fondos genéticos que indican los símbolos se describen en la Tabla 3. Actividad de β-galatosidasa en símbolos cerrados; crecimiento en símbolos abiertos. Los datos son el promedio de al menos tres experimentos independientes.

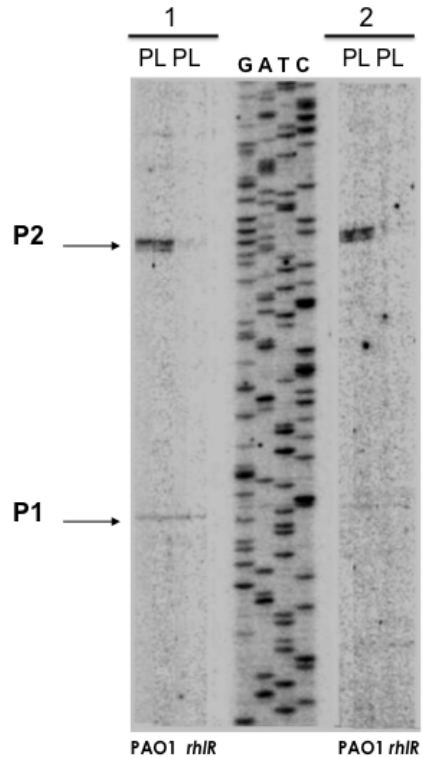


Figura 14. Identificación de los inicios de transcripción del promotor de *rmIB* en distintos medios de cultivo y temperaturas. Se indican los carriles con los productos obtenidos con el RNA de las cepas PAO1/pRMLP-1 y PAO1(*rhIR*)/pRMLP-1. Ambas cepas se crecieron a 37° C en PPGAS (P) o LB (L). Las muestras se obtuvieron a 0.6 (1) y 1.5 DO_{600nm} (2) de crecimiento. Las flechas indican los sitios identificados.

La inducción de la expresión del operón *rmIBDAC* en un medio de baja producción de ramnolípidos (medio LB; Ochsner y col., 1994) sucede desde las 6 h de crecimiento (Figura 13c); sin embargo, ésta solo es 0.5 veces mayor que la expresión basal. En ambos medios, LB y PPGAS, la expresión del promotor P2 depende de RhIR (Figura 14) y dicha regulación es independiente de la fase de crecimiento según los resultados de “primer extension”. Debido a que que la producción de ramnolípidos es muy baja en LB y nula a las 6 h de crecimiento (sólo se detecta en la fase estacionaria tardía de crecimiento) pudiera ser que el transcrito del operón *rmIBDAC* esté regulado postranscripcional o postraduccionalmente en condiciones de baja producción de ramnolípidos y de manera independiente a RhIR.

7. CONCLUSIONES

En el presente trabajo demostramos que el operón *rmIBDAC* se expresa constitutivamente durante la fase exponencial de crecimiento y aumenta su expresión durante la fase estacionaria. Esta inducción se observó en dos medios de cultivo distintos y a distintos tiempos: en la fase estacionaria tardía en medio de alta producción de ramnolípidos (medio PPGAS) y en la fase estacionaria temprana en medio de baja producción (medio LB). Esta inducción de la expresión en la fase estacionaria es dependiente de RhIR, σ^S y la temperatura (sólo se induce a 37° C).

La expresión del operón se da a partir de tres promotores. El promotor P1 es responsable de la expresión basal del operón, el cual no modifica su actividad transcripcional a lo largo de la curva de crecimiento. Dicho promotor se regula de manera independiente a RhIR y σ^S . A pesar del que el promotor P1 contiene secuencias consenso para σ^N , no fue posible demostrar su efecto bajo las condiciones estudiadas. El promotor P2 es el responsable de la inducción durante la fase estacionaria y es parcialmente dependiente de los reguladores RhIR y σ^S . El promotor P2 presenta una caja *las* atípica que es reconocida específicamente por RhIR. Este regulador se puede unir a la caja *las* atípica en presencia y ausencia del autoinductor C₄-HSL. La caja *las* atípica es funcional y regula la expresión del operón *rmIBDAC* a través del complejo RhIR/C₄-HSL. Este es el primer trabajo donde se identifica una secuencia funcional de reconocimiento específico para RhIR. Adicionalmente, se indentificó la actividad transcripcional de un tercer promotor P3, el cual es funcional solo en ausencia de RhIR.

Finalmente, la sobre expresión del operón *rmIBDAC* favorecería la sobre producción dTDP-L-ramnosa en la fase estacionaria de manera dependiente a la respuesta QS a través del regulón *rhl*. Los genes *rhlAB* y *rhlC*, pertenecen a dicho regulón y, en conjunto, favorecerían la producción de ramnolípidos durante la fase estacionaria.

8. PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto de la temperatura sobre la expresión del operón *mlBDAC*.
- Identificar las secuencias regulatorias dependientes de σ^S en el promotor de *mlB*.
- Determinar el sitio de inicio del promotor P3.
- Demostrar si la caja *las I* identificada *in silico* es funcional, si es reconocida por RhlR y/o LasR y si tiene un efecto sobre la expresión del promotor P3.
- Determinar las condiciones regulatorias del promotor P1 de *mlB*, identificando si es dependiente de σ^N , como sugiere la secuencia.

9. REFERENCIAS

- Allard, S.T., Giraud, M.F., Whitfield, C., Graninger, M., Messner, P. y Naismith, J.H.** (2001) The crystal structure of dTDP-D-Glucose 4, 6-dehydratase (RmlB) from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, the second enzyme in the dTDP-L-rhamnose pathway. *J. Mol. Biol.* **307**(1): 283-295.
- Anderson, R.M.; Zimprich, C.A. y Rust, L.** (1999) A second operator is involved in *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) activation. *J. Bacteriol.* **181**: 6264-6270.
- Atzél, B.; Szoboszlay, S.; Mikuska, Z. y Kriszt, B.** (2008) Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **211**(1-2): 143-55.
- Bardoel, B.W.; van der Ent, S.; Pel M.J.; Tommassen, J.; Pieterse, C.M.; van Kessel, K.P. y van Strijp, J.A.** (2011) *Pseudomonas* evades immune recognition of flagellin in both mammals and plants. *PLoS Pathog.* **7**(8): 1-11.
- Blankenfeldt, W., Giraud, M.F., Leonard, G., Rahim, R., Creuzenet, C., Lam, J.S. y Naismith, J.H.** (2000b) The purification, crystallization and preliminary structural characterization of glucose-1-phosphate thymidyltransferase (RmlA), the first enzyme of the dTDP-L-rhamnose synthesis pathway from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **56**(Pt 11): 1501-1504.
- Breidenstein, E.B.; de la Fuente-Núñez, C. y Hancock, R.E.** (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol.* **19**(8): 419-26.
- Bystrova, O.V.; Knirel, Y.A.; Lindner, B.; Kocharova, N.A.; Kondakova, A.N.; Zähringer, U. y Pier, G.B.** (2006) Structures of the core oligosaccharide and O-units in the R- and SR-type lipopolysaccharides of reference strains of *Pseudomonas aeruginosa* O- serogroups. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* **46**(1): 85-99.
- Cabrera N, A.-P. Richardson, C. Olvera, L. G. Treviño, E. Déziel, F. Lépine y G. Soberón-Chávez.** (2006) Mono-rhamno-lipid and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**(1): 187-194.
- Cheng, K.-J; Ingram, J.M. y Costerton, J.W.** (1970) Release of alkaline phosphatase from cells of *Pseudomonas aeruginosa* by manipulation of cation concentration and of pH. *J.Bacteriol.* **104**: 748-753.
- Chiang, S.M. y Schellhorn, H.E.** (2010) Evolution of the RpoS regulon: Origin of RpoS and the conservation of RpoS-dependent regulation in bacteria. *J. Mol. Evol.* **70**: 557-571.

Clatworthy, A.E.; Lee, J.S.W.; Leibman, M.; Kostun, Z.; Davidson, A.J. y Hung, D.T. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants. *Infect. Immun.* **77**(4): 1293-1303.

Croda-García, G.; Grosso-Becerra, V.; Gonzalez-Valdez, A.; Servín-González, L. y Soberón-Chávez, G. (2011) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR: role of the CRP orthologue Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhIR. *Microbiology.* **157**: 2545-2555.

Davey, M.E.; Caiazza, N.C. y O'Toole, G.A. (2003) Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **185**: 1027-1036.

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

Dekimpe, V. y Déziel, E. (2009) Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. *Microbiol.* **155**: 712-723.

Déziel E., F. Lépine, S. Milot y R. Villemur. (2003) *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol.* **149**: 2005-2013.

Domínguez-Cuevas, P.; Marín, P.; Ramos, J.L. y Marqués, S. (2005) RNA polymerase holoenzymes can share a single transcription start site for the Pm promoter. Critical nucleotides in the -7 to -18 region are needed to select between RNA polymerase with sigma38 or sigma32. *J. Biol. Chem.* **280**(50): 41315-23.

Fujita, M.; Tanaka, K.; Takahashi, H. y Amemura, A. (1994) Transcription of the principal sigma-factor genes, *rpoD* and *rpoS*, in *Pseudomonas aeruginosa* is controlled according to the growth phase. *Mol. Microbiol.* **13**: 1071-1077.

Fuqua, W.C.; Parsek, M. y Greenberg, E.P. (2001) Regulation of the gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum-sensing. *Annu. Rev. Genet.* **35**: 439-468.

Gallagher, L.A.; McKnight, S.L.; Kuznetsova, M.S.; Pesci, E.C. y Manoil, C. (2002) Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **184**: 6472-6480.

Gaonkar, T.; Nayak, P.K.; Garg, S. y Bhosle, S. (2012) Siderophore-producing bacteria from a sand dune ecosystem and the effect of sodium benzoate on siderophore production by a potential isolate. *Scien. World J.* Epub. 2 de mayo.

Gilbert, K.B.; Kim, T.H.; Gupta, R.; Greenberg, E.P. y Schuster M (2009) Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Mol. Microbiol.* **73**: 1072-1085.

Girard, G. y Bloemberg, G.V. (2008) Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol.* **3**(1): 97-106.

Greeberg, E.P. (1997) Quorum sensing in a gram-negative bacteria. *ASM News.* **63**: 371-377.

Hauser. A.R.; Jain, M.; Bar-Meir, M. y McColley, S.A. (2011) Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**: 29-70.

Hengge-Aronis; R. (2002) Signa transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Biol. Rev.* **66**: 373-395.

Hentzer, M.; Wu, H.; Andersen, J.B.; Riedel, K.; Rasmussen, T.B.; Bagge, N.; Kumar, N.; Schembri, M.A.; Song, Z.; Kristoffersen, P.; Manefield, M.; Costerton, J.W.; Molin, S.; Eberl, L.; Steinberg, P.; Kjelleberg, S.; Høiby, N. y Givskov, M. (2003) Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J.* **22**(15): 3803-15.

Hong, C.S.; Kuroda, A; Takiguchi, N.; Ohtake, H. y Kato, J. (2005) Expression of *Pseudomonas aeruginosa aer-2*, one of two aerotaxis transducer genes, is controlled by RpoS. *J Bacteriol.* **187**(4): 1533-5.

Karadzic, I.; Masui, A.; Zivkovic, L.I. y Fujiwara, N. (2006) Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from putrid mineral cutting oil as component of metalworking fluid. *J. Biosci. Bioeng.* **102** (2): 82-9.

Khan, N.H.; Ahsan, M.; Yoshizawa, S.; Hosoya, S.; Yokota, A. y Kogure, K. (2008) Multilocus sequence typing and phylogenetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from the ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**(20): 6194-205.

King, J.D.; Kocíncová, D.; Westman, E.L. y Lam, J.S. (2009) Lipopolysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Innate. Immunity.* **15**(5): 261-312.

Kipnis. E.; Sawa, T. y Wiener-Kronish, J. (2006) Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et Maladies Infectieuses.* **36**: 78-91.

Kiratisin, P., Tucker, K.D. y Passador, L. (2002) LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes functions as a multimer. *J. Bacteriol.* **184**: 4912-4919.

Kocíncová, D.; Ostler, S.L.; Anderson, E.M. y Lam, J.S. (2012) Rhamnosyltransferase genes migA and wapR are regulated in a differential manner to modulate the quantities of core oligosaccharide glycoforms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **194**(16): 4295-300.

Lam, J.S.; Taylor, V.L.; Islam, S.T.; Hao, Y. y Kocíncova, D. (2011) Genetic and functional diversity of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Front Microbiol.* **2**(118): 1.

Lang, S. y Wullbrandt, D. (1999) Rhamnose lipids--biosynthesis, microbial production and application potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* **51**(1): 22-32.

Limmer, S; Quintin, J.; Hetru, C. y Ferrandon, D. (2011) Virulence on the fly: *Drosophila melanogaster* as a model genetic organism to decipher host-pathogen interactions. *Curr. Drug. Targets.* **12**(7): 978-99.

Lyczaka, J.B.; Cannonb, C.L. y Piera, G.B. (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist *Microbes. Infect.* **2**(9): 1051-60.

Marolda, C.L. y Valvano, M.A. (1995) Genetic analysis of the dTDP-rhamnose biosynthesis region of the *Escherichia coli* VW187 (O7:K1) rfb gene cluster: identification of functional homologs of rfbB and rfbA in the rff cluster and correct location of the rffE gene. *J Bacteriol.* **177**(19): 5539-46.

Martin, S.J. y Yost, R.J. (2011) Infectious diseases in the critically ill patients. *J. Pharm. Pract.* **24**(1): 35-43.

Medina, B. G. (2003) "Estudio del mecanismo de regulación transcripcional por la proteína RhIR de *Pseudomonas aeruginosa*". Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Cuernavaca, México. 80 p.

Medina, G., Juárez, K., Díaz, R. y Soberón-Chávez, G. (2003a) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhIR encoding a quorum sensing regulatory protein. *Microbiol-UK.* **149**: 3073-3081.

Medina, G., Juárez, K. y Soberón-Chávez, G. (2003b) The *Pseudomonas aeruginosa* rhIAB operon is not expressed on the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhIR and the autoinducer *N*-butanoyl-homoserine lactone. *J. Bacteriol.* **185**: 377-380.

Medina, G.; Juárez, K.; Valderrama, B. y Soberón-Chávez, G. (2003c) Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of *rhlAB* promoter. *J. Bacteriol.* **185**: 377-380.

Mena, K.D. y Gerba, C.P. (2009) Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environ Contam Toxicol.* **201**: 71-115.

Miller, J.H. (1992) A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. pp. 43-80.

Moore, N.M. y Flaws, M.L. (2011) Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin. Lab. Sci.* **24**(1): 43-6.

Morgan, A.F. (1979) Transduction of *Pseudomonas aeruginosa* with a mutant of bacteriophage E79. *J. Bacteriol.* **139**: 137-140.

Nitschke, M.; Costa, S.G.V.A.O. y Contiero, J. (2005) Rhamnolipid Surfactants: An Update on the General Aspects of These Remarkable Biomolecules. *Biotechnol. Prog.* **21**: 1593-1600.

Ochsner, U.A., Fiechter, A. y Reiser, J. (1994) Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.* **269**: 19787-19795.

Olvera, C. C. (2000) Biosíntesis de la TDP-L-ramnosa y su regulación genética en *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Bioquímica). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Cuernavaca, México. 61 p.

Poon, K.K.; Westman, E.L.; Vinogradov, E.; Jin, S. y Lam, J.S. (2008) Functional characterization of MigA and WapR: putative rhamnosyltransferases involved in outer core oligosaccharide biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **190**: 1857-1865.

Rahim, R., L.L. Burrows, M.A. Monteiro, M.B. Perry y J.S. Lam. (2000) Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* **146**: 2803-2814.

Rahim, R., Ochsner, U.A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J.S. y Soberón-Chávez, G. (2001) Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **40**: 708-718.

Sadovskaya, I.; Brisson, J.R.; Thibault, P.; Richards, J.C.; Lam, J.S. y Altman, E. (2000) Structural characterization of the outer core and the O- chain linkage

region of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5. *Eur. J. Biochem.* **267**: 1640-1650.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

Schuster, M. y Greenberg, E.P. (2007) Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics.* **8**: 287. (<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/287>).

Schuster, M. y Greenberg, E.P. (2006) A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**(2-3): 73-81.

Schuster, M., Hawkins, A.C., Harwood, C.S. y Greenberg, E.P. (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol. Microbiol.* **51**: 973-985.

Schuster, M.; Lostroh, C.P.; Ogi, T. y Greenberg, E.P. (2003) Identification, timing and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: A transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* **185**: 2066-2079.

Schwartz, T.; Volkman, H.; Kirchen, S.; Kohnen, W.; Schön-Hölz, K.; Jansen, B. y Obst, U. (2006) Real-time PCR detection of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical and municipal wastewater and genotyping of the ciprofloxacin-resistant isolates. *FEMS Microbiol. Ecol.* **57**(1): 158-67.

Selezska, K; Kazmierczak, M.; Müsken, M.; Garbe, J.; Schobert, M.; Häussler, S.; Wiehlmann, L.; Rohde, C. y Sikorski, J. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus: impact of water quality and phage pressure. *Environ. Microbiol.* Mar 6. [Epub ahead of print]

Silby, M.W.; Winstanley, C.; Godfrey, S.A.; Levy, S.B. y Jackson R.W. (2011) *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**(4): 652-80.

Smith, R.S. e Iglewski, B.H. (2003) *Pseudomonas aeruginosa* quórum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 56-60.

Soberón-Chávez, G., Lépine, F. y Déziel, E. (2005b) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**: 718- 12.

Soberón-Chávez, G.; Aguirre-Ramírez, M. y Ordóñez, L. (2005a) Is *Pseudomonas aeruginosa* only "sensing quórum"? *Crit. Rev. Microbiol.* **31**: 171-182.

Soberón-Chávez, G. (2001) Microbios en línea. Capítulo 3: *Pseudomonas aeruginosa*. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>

Starkey, M. y Rahme L.G. (2009) Modeling *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis in plant hosts. *Nat. Protoc.* **4**(2): 117-24.

Stevenson, G.; Neal, B.; Liu, D.; Hobbs, M.; Packer, N.H.; Batley, M.; Redmond, J.W.; Lindquist, L. y Reeves, P. (1994) Structure of the O antigen of *Escherichia coli* K-12 and the sequence of its rfb gene cluster. *J Bacteriol.* **176**(13): 4144-56.

Typas, A.; Becker, G. y Hengge, R. (2007) The molecular basis of selective promoter activation by the σ^S subunit of RNA polymerase. *Mol. Microbiol.* **63**: 1296-1306.

Urbanowski, M.L.; Lostroh, C.P. y Greenberg, E.P. (2004) Reversible acyl-homoserine lactone binding to purified *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J. Bacteriol.* **186**: 631-637.

Van Delden, C. e Iglewski, B. (1998) Cell-to-cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* **4**(4): 551-560.

Venturi, V. (2006) Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS. Microbiol. Rev.* **30**: 274-291.

Virulence Factors Database of Patogenic Bacteria. State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, Beijing, China. <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Pseudomonas>. Consulta agosto 2012.

Wagner, E.V.; Bushnell, D.; Passador, L.; Brooks, A.I. e Iglewski, B.H. (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulon: Effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* **185**: 2080-2095.

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

Whiteley, M.; Parsek, M.R. y Greenberg, E.P. (2000) Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**(15): 4356-4360

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

Wingender, J. y Flemming, H.C. (2011) Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **214**(6): 417-23.

Winzer, K.; Falconer, C.; Garber, N.C.; Diggle, S.P.; Cámara, M. y Williams, P. (2000) The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J. Bacteriol.* **182**: 6401-6411.

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

Zaborina, A.; Romanowskia, K.; Gerdesb, S.; Holbrooka, C.; Lepinec, F.; Longa, J.; Poroykoa, V.; Diggled, S.P.; Wilkee, A.; Righetid, K., Morozovaa, I.; Babrowskia, T.; Liua, D.C.; Zaborinaa, O. y Alverdya, J.C. (2009) Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *PNAS.* **106** (15): 6327-6332.

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

Zhang, Y. y Miller, R.M. (1994) Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**(6): 2101-2106.

Zhu, K. y Rock, C.O. (2008) RhIA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the beta-hydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **190**: 3147-3154.

ANEXO I

Artículo: The *Pseudomonas aeruginosa* *rmIBDAC* operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhIR and the alternative sigma factor σ^S . Marisela Aguirre-Ramírez, Gerardo Medina, Abigail González-Valdez, Victoria Grosso-Becerra y Gloria Soberón-Chávez. *Microbiology* (2012) 158, 908-916.

The *Pseudomonas aeruginosa* *rmBDAC* operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhlR and the alternative sigma factor σ^S

Marisela Aguirre-Ramírez,^{1†} Gerardo Medina,² Abigail González-Valdez,¹ Victoria Grosso-Becerra¹ and Gloria Soberón-Chávez¹

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México D. F., México

²Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, BC, México

Correspondence

Gloria Soberón-Chávez
gloria@biomedicas.unam.mx

Received 14 September 2011
Revised 2 January 2012
Accepted 13 January 2012

Pseudomonas aeruginosa produces as biosurfactants rhamnolipids, containing one (mono-rhamnolipid) or two (di-rhamnolipid) L-rhamnose molecules. The rhamnosyltransferase RhlB catalyses the synthesis of mono-rhamnolipid using as precursors dTDP-L-rhamnose and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) produced by RhlA, while the rhamnosyltransferase RhlC synthesizes di-rhamnolipid using mono-rhamnolipid and dTDP-L-rhamnose as substrates. The Las and Rhl quorum-sensing systems coordinately regulate the production of these surfactants, as well as that of other exoproducts involved in bacterial virulence, at the transcriptional level in a cell density-dependent manner. In this work we study the transcriptional regulation of the *rmBDAC* operon, encoding the enzymes involved in the production of dTDP-L-rhamnose, the substrate of both rhamnosyltransferases, RhlB and RhlC, and also a component of *P. aeruginosa* lipopolysaccharide. Here we show that the *rmBDAC* operon possesses three promoters. One of these transcriptional start sites (P2) is responsible for most of its expression and is dependent on the stationary phase sigma factor σ^S and on RhlR/C₄-HSL through its binding to an atypical 'las box'.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen that causes serious nosocomial infections. The secretion of numerous toxic compounds and hydrolytic enzymes that are involved in its pathogenicity is coordinately regulated at the transcriptional level by the so-called quorum-sensing response (QSR) (von Bodman *et al.*, 2008; Williams & Cámara, 2009). These exoproducts include proteases, phospholipase C, exotoxins, pyocyanin and rhamnolipids (Lazdunski *et al.*, 2004; Williams & Cámara, 2009).

In liquid culture, *P. aeruginosa* mainly produces two forms of rhamnose-containing glycolipid biosurfactant: rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (mono-rhamnolipid)

and rhamnosyl-rhamnosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoate (di-rhamnolipid). The biosynthesis of these tensio-active molecules proceeds by two sequential rhamnosyl transfer reactions, each catalysed by a specific rhamnosyltransferase (RhlB and RhlC, respectively), with deoxythymidine diphospho-L-rhamnose (dTDP-L-rhamnose) acting as rhamnosyl donor in both reactions and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the product of RhlA catalysis (Déziel *et al.*, 2003; Cabrera-Valladares *et al.*, 2006), or mono-rhamnolipid acting as the respective recipients. The general biosynthetic pathway of rhamnolipids has been reviewed (Soberón-Chávez *et al.*, 2005b; Müller & Hausmann, 2011), and evidence of their role as virulence factors has been published (Zulianello *et al.*, 2006).

Besides being a rhamnolipid precursor, dTDP-L-rhamnose is a lipopolysaccharide (LPS) precursor in a variety of bacteria, including *P. aeruginosa* (Rahim *et al.*, 2000). This activated sugar has been implicated in bacterial pathogenicity (Ma *et al.*, 1997, 2001; Bozue *et al.*, 2005; Engels-Deutsch *et al.*, 2003). The dTDP-L-rhamnose biosynthetic pathway consists of the conversion of glucose 1-phosphate to dTDP-L-rhamnose via dTDP-glucose, dTDP-6-deoxy-D-xylo-4-hexulose and dTDP-6-deoxy-L-xylo-4-hexulose

[†]Present address: Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Mexico.

Abbreviations: C₄-HSL, butanoyl-homoserine lactone; 3O-C₁₂-HSL, 3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone; RNAP, RNA polymerase; QS, quorum sensing; QSR, quorum-sensing response.

A supplementary table, showing oligonucleotides used in this study, is available with the online version of this paper.

(Marumo *et al.*, 1992). The enzymes in this pathway are highly conserved among bacteria and are absent from eukaryotic cells, thus making them potential targets for antibacterial drugs (Ma *et al.*, 1997, 2001).

The transcriptional regulation of the genes encoding the enzymes directly involved in rhamnolipid synthesis has been reported. Both the *rhlAB* (Ochsner *et al.*, 1994) and PA1131-*rhlC* (Rahim *et al.*, 2001) operons are positively regulated by RhlR, which belongs to the family of LuxR transcription activators (Lazdunski *et al.*, 2004; von Bodman *et al.*, 2008; Williams & Cámara, 2009). The members of this family respond to the so-called bacterial autoinducers, *N*-acylated homoserine lactones that harbour acyl constituents of various lengths. These small signalling molecules accumulate and activate gene expression at high bacterial densities through the interaction with specific transcriptional activators.

RhlR activates gene expression when coupled with butanoyl-homoserine lactone (C_4 -HSL) (Medina *et al.*, 2003c) through binding to a specific DNA sequence. 'las boxes' are conserved DNA sequences recognized by RhlR or LasR, the second quorum sensing (QS) transcription activator present in *P. aeruginosa* (Whiteley & Greenberg, 2001). These sequences determine whether LasR, RhlR or both regulatory proteins regulate a gene, and subtle changes may represent a big difference in the regulatory protein binding affinity (Whiteley & Greenberg, 2001; de Kievit *et al.*, 2002; Schuster & Greenberg, 2007). LasR is only able to dimerize and bind to its target DNA sequence in the presence of the autoinducer 3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone (3O- C_{12} -HSL) (Kiratisin *et al.*, 2002), while RhlR binds to *rhlA* las box in both the absence and the presence of C_4 -HSL (Medina *et al.*, 2003c). In the former case it functions as a repressor, while in the latter it activates transcription (Medina *et al.*, 2003c).

After a mutagenesis screen for genes regulated by QS, it was postulated that genes activated only by LasR/3O- C_{12} -HSL possessed las boxes with the sequence NNCTN₁₂AGNN, where nucleotides in bold type are invariable (Whiteley *et al.*, 1999). However, it has been reported that las boxes with 11 nt instead of 12 nt between the invariable nucleotides are also functional and recognized by LasR (Medina *et al.*, 2003a; Croda-García *et al.*, 2011). It has also been proposed that genes regulated by RhlR and LasR possess the sequence NNCTN₃AN₄TN₃AGNN (Whiteley *et al.*, 1999). These sequences are called las boxes because they bind both QS regulatory proteins, albeit with different affinities (Whiteley & Greenberg, 2001; Soberón-Chávez *et al.*, 2005a). Following an *in silico* analysis of genes that seem to be directly regulated by RhlR, the existence was proposed of an RhlR-specific DNA-binding sequence (rhl box) with the sequence N₂CTNCCAGN₂TTNGNAGN, where nucleotides in bold type are invariable (Schuster & Greenberg, 2007). However, no experimental evidence has been reported on the existence of an RhlR-specific box that lacks the conserved AG dinucleotide at positions 17 and 18.

In *P. aeruginosa*, the stationary phase sigma factor σ^S has been shown to influence the expression of different QS-regulated traits, showing a very complex interaction with this system (Schuster *et al.*, 2004a; Schuster & Greenberg, 2007). It has been reported that the genes that encode lectins have a σ^S -dependent promoter (Winzer *et al.*, 2000), and that the transcription of the *rhlAB* promoter itself is partially dependent on this sigma factor (Medina *et al.*, 2003b).

The enzymes involved in the dTDP-L-rhamnose biosynthetic pathway are encoded by *rmlA*, *rmlB*, *rmlC* and *rmlD* in *P. aeruginosa* (Rahim *et al.*, 2000). These genes are arranged as an operon (*rmlBDAC*) (Rahim *et al.*, 2000). Following transcriptome analysis, the *rmlBDAC* operon has been suggested to be induced by QS (Schuster *et al.*, 2003), but this proposal has not been further addressed experimentally, and the precise mechanism of this regulation has not been reported.

Another *P. aeruginosa* gene involved in LPS biosynthesis, called *migA*, has been shown to be regulated by the QSR, specifically by RhlR (Yang *et al.*, 2000), although the precise role of MigA in LPS formation has not been determined.

The aim of this work is the study of the transcriptional regulation of the *rmlBDAC* operon in a culture medium where high levels of rhamnolipids are produced, and to determine the role of the QSR in this regulation. We show that this operon has three promoters and that the expression of one of these (P2) is dependent on the stationary phase sigma factor σ^S and on the QS regulator RhlR. This promoter has an atypical las box (*rmlB* box) centred at -44.5 nt from the P2 transcriptional start site, which is shown to be functional for RhlR/ C_4 -HSL binding and to be responsible for most of the transcriptional activation of this operon. We show that the *rml* box is a specific RhlR DNA-binding sequence (an rhl box), since it is not recognized by LasR/3O- C_{12} -HSL at a detectable level. This is believed to be the first reported case of a DNA sequence which is recognized solely by RhlR and not by LasR/3O- C_{12} -HSL.

METHODS

Microbiological procedures. Bacterial strains and plasmids used in this work are shown in Table 1. The sequences of the oligonucleotides used are shown in Supplementary Table S1. *P. aeruginosa* strains were grown on PPGAS (Zhang & Miller, 1992) or on Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972) medium at 37 °C and 225 r.p.m. Antibiotic concentrations used were (in $\mu\text{g ml}^{-1}$): ampicillin (Ap) 200, carbenicillin (Cb) 200, gentamicin (Gm) 300 and tetracycline (Tc) 150. β -Galactosidase activity was determined as reported by Miller (1972). One Miller unit corresponds to 1 nanomole of ONPG hydrolysed per minute per OD₆₀₀ unit. IPTG was used at a concentration of 1 mM, while C_4 -HSL and 3O- C_{12} -HSL were both used at 10 μM in the experiments presented in Table 2. Expression of plasmid pMPRML-3 in *Escherichia coli* was induced in the presence of 10 μM C_4 -HSL or 1 μM 3O- C_{12} -HSL (Fig. 3).

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
Strains		
PAO1	<i>P. aeruginosa</i> wild-type strain	Hancock & Carey (1979)
PAO1 Δ <i>rhlR</i>	PAO1 derivative, Δ <i>rhlR</i> :: <i>Gm</i>	Rahim <i>et al.</i> (2001)
PAS1	PAO1 derivative, <i>rpoS</i> :: <i>Gm</i>	Medina <i>et al.</i> (2003b)
MC4100	<i>E. coli</i> , <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lacU169</i>) <i>rpsL150 thiA1 relA1 fib5301 deoC ptsF25 rbsR</i>	Casadaban (1976)
ABI-rhlA	MC4100 derivative with a chromosomal Φ (<i>pZrhlA-lacZ</i>)	This work
ABI-rmlB1	MC4100 derivative with a chromosomal Φ (<i>pZrmlB1-lacZ</i>)	This work
ABI-lasI	MC4100 derivative with a chromosomal Φ (<i>pZlasI-lacZ</i>)	This work
Plasmids		
pLP170	Transcriptional <i>lacZ</i> fusion vector that contains an origin of replication for both <i>E. coli</i> and <i>P. aeruginosa</i> ; Ap ^r	Pearson <i>et al.</i> (1997)
pRML-P1	pLP170 derivative with a <i>rmlB-lacZ</i> fusion containing the upstream tRNA gene with its promoter region as well as the complete 5' <i>rmlB</i> region, Ap ^r	Cabrera-Valladares <i>et al.</i> (2006)
pRML-2	Deletion derivative of pRML-P1 containing the entire <i>rmlB</i> upstream region, starting at an internal position of the upstream tRNA gene, Ap ^r . Oligonucleotides rmlB62 and rmlBm (Supplementary Table S1) were used to construct this plasmid	This work
pRML-3	Deletion derivative of pRML-P1 containing only the sequences of the <i>rml</i> box and the downstream sequences, Ap ^r . Oligonucleotides rmlB62 and rmlBc (Supplementary Table S1) were used to construct this plasmid	This work
pRML-4	pUCP18 derivative encoding the <i>rmlBDAC</i> operon (6.3 kb) under its own promoter, Ap ^r	Cabrera-Valladares <i>et al.</i> (2006)
pRML-P1(AA)	pRML-P1 derivative containing a mutation in the dinucleotide GC to AA at positions 3 and 4 of the <i>rml</i> box. Constructed with oligonucleotides lasIAA and lasIAAr (Supplementary Table S1)	This work
pRML-P1(CC)	pRML-P1 derivative containing a mutation (changing AA at positions -89 and -90 to CC) in the -10 sequence of promoter P2. Constructed with oligonucleotides P210CC and P210CC-r (Supplementary Table S1)	This work
pRML-2(CC)	pRML-2 derivative containing a mutation (changing AA at positions -151 and -150 to CC) in the -10 sequence of promoter P3. Constructed with oligonucleotides P310CC and P310CC-r (Supplementary Table S1)	This work
pMP220	Vector to construct transcriptional <i>lacZ</i> fusions, Tc ^r	Spaink <i>et al.</i> (1987)
pMPRML-3	pMP220 derivative with a <i>rmlB-lacZ</i> fusion containing the same insert as pRML-3, Tc ^r	This work
pGMYC	pUCP20 derivative encoding RhlR, expressed under the <i>lac</i> promoter, Ap ^r	Medina <i>et al.</i> (2003c)
pMT1	pUCP20 derivative encoding LasR, expressed under the <i>lac</i> promoter, Ap ^r	Medina <i>et al.</i> (2003a)

Nucleic acid procedures. DNA manipulations were done as reported by Sambrook & Russell (2001). DNA sequencing reactions were done using the Thermo Sequenase kit (Amersham Life Science). Oligonucleotides were radioactively labelled with T4 polynucleotide kinase (Amersham Life Science) using [γ -³²P]ATP [3000 Ci mmol⁻¹ (111 TBq mmol⁻¹), Perkin Elmer Life Science] as substrate. The construction of a point mutation was done using a QuikChange II XL site directed mutagenesis kit (Stratagene). All the constructions were verified by automated sequencing using oligonucleotide lacZr (Supplementary Table S1).

Primer extension analysis. *P. aeruginosa* strains were grown to OD₆₀₀ 0.6 or 1.5 and their total RNA was extracted using an RNeasy kit (Qiagen). Primer extension reactions were done using the SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Reactions were carried out at 55 °C. The experiments were done using oligonucleotide rmlB+87 (Supplementary Table S1). The sequencing reaction was done with a fmol DNA Cycle Sequencing System (Promega) using pRML-4 (Cabrera-Valladares *et al.*, 2006) as template.

Determination of RhlR DNA-binding ability. To measure RhlR binding to different DNA sequences (*las* boxes) *in vivo*, we followed the procedure described previously (Croda-García *et al.*, 2011) to construct hybrid promoters with consensus -10 and -35 RNA polymerase (RNAP) recognition sequences separated by 19 bp of the sequence corresponding to a *las* box. We used either an *rhlA* or a *lasI* *las* box as a control (Table 2).

Briefly, the procedure was as follows. Complementary oligonucleotides with synthetic promoter sequences and an *rhlA*, *rmlB* or *lasI* *las* box between the -10 and -35 RNAP recognition sites flanked by *EcoRI* and *BamHI* restriction sites, were hybridized to form a dsDNA fragment and cloned into plasmid pRS551 (Simons *et al.*, 1987) to produce transcriptional *lacZ* fusions. These plasmid-encoded *lacZ* fusions were introduced into the *E. coli* MC4100 chromosome by the method of Simons *et al.* (1987). Plasmids encoding RhlR (pGMYC; Medina *et al.*, 2003c) or LasR (pMT1; Medina *et al.*, 2003a) were introduced into *E. coli* strains (ABI-rhlA, ABI-rmlB1 and ABI-lasI, Table 1) harbouring the chromosomally encoded *lacZ* fusions with the synthetic promoters. The extent of *lacZ* repression in the presence

Table 2. Ability of RhlR and LasR to bind different DNA sequences, as determined by repression of the *lacZ* expression of synthetic promoters carrying the sequences shown between the -10 and -35 consensus RNAP binding sequences

Values shown are percentage repression, expressed using as 100% the β -galactosidase activity of the chromosomal synthetic *lacZ* fusion in the presence of the empty vector pUCP20. Plasmid pGMYC expresses the *rhlR* gene and pMT1 expresses the *lasR* gene. Data shown are the mean from three independent experiments and enzymic activity was determined in triplicate. Bold type shows nucleotides which have been reported to be conserved in las boxes recognized by LasR and RhlR; italic type shows the atypical nucleotides in the *rml* box.

Box	Sequence (5'–3')	RhlR		LasR	
		C ₄ -HSL (10 μ M)	No C ₄ -HSL	3O-C ₁₂ HSL (10 μ M)	No 3O-C ₁₂ -HSL
<i>lasI</i>	ATCTATCTCATTGCTAGTT	>1	>1	70 \pm 10	>1
<i>rhlA</i>	TCCTGTGAAATCTGGCAGTT	50 \pm 1.5	50 \pm 1.5	5 \pm 3	>1
<i>rml</i>	ACCTACCAGATCTGGGGTTG	50 \pm 5	50 \pm 5	>1	>1

of RhlR, RhlR/C₄-HSL or LasR/3O-C₁₂-HSL corresponds to the binding of these proteins with or without their corresponding autoinducers (Table 2).

RESULTS AND DISCUSSION

Transcriptional regulation of the *rmlBDAC* operon

P. aeruginosa produces high rhamnolipid levels, starting at the early stationary phase when cultivated under phosphate-limited conditions (Zhang & Miller, 1992). This increased production is due to an increase in RhlR-dependent *rhlAB* and *rhlC* transcription (Ochsner *et al.*, 1994; Rahim *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 2003c). A positive autoregulatory loop regulates RhlR expression from the *rhlAB* promoter (Croda-García *et al.*, 2011). To determine whether rhamnolipid production was accompanied by an increase in the synthesis of dTDP-L-rhamnose, we measured the expression of the *rmlBDAC* operon using an *rmlB-lacZ* transcriptional fusion (pRML-P1, Table 1) during growth of strain PAO1 on phosphate-limited PPGAS medium. The results showed that *rmlBDAC* expression and presumably dTDP-L-rhamnose synthesis were high throughout the *P. aeruginosa* growth curve, and that they were further induced at the start of the stationary phase (Fig. 1a). The dTDP-L-rhamnose synthesized during the exponential phase of growth is presumably used in LPS synthesis, while the induction of *rmlBDAC* transcription coincides with rhamnolipid biosynthesis.

Using primer extension analysis of the *rmlBDAC* upstream region we detected two transcription initiation sites (Fig. 2a). One of these promoters (P1), located at -28 nt from the translational start site (Fig. 2b), seems to be expressed at a low level (Fig. 2a) and has the characteristics of promoters expressed by RNAP containing a σ^{54} subunit, since it has the sequence 5'-GGGACGTGTCGAAGC-3', where nucleotides in bold type correspond to typical -24 (GG) and -12 (GC) dinucleotides, present on promoters transcribed by RNAP containing this alternative sigma factor (Fig. 2b). Upstream of this putative σ^N promoter, we identified sequences compatible with FleQ and integration host factor (IHF) binding (data not shown). The

functionality of these factors for P1 expression was not further investigated. The other transcriptional start site detected by primer extension (P2), located at -81 nt from the translational start site (Fig. 2a, b), seems to be responsible for most of the transcription of the *rmlBDAC* operon (Fig. 1a), as it shows a high level of expression (Fig. 2a).

The putative -10 (5'-TACTAA-3') and -35 (5'-TTGGCA-3') sequences corresponding to the P2 promoter are separated by 18 bp (Fig. 2b). Adjacent to the P2 promoter and centred at -44.5 bp from this start site we detected a sequence resembling a las box, but with an atypical sequence (5'-ACCTACCAGATCTGGGGTTG-3') that did not contain the AG sequence at positions 17 and 18 that has been reported to be invariable for LasR and RhlR recognition sequences (Whiteley & Greenberg, 2001; Whiteley *et al.*, 1999). The functionality of this atypical las box is addressed below.

Transcription of the *rmlBDAC* operon from the P2 start site is RhlR- and σ^S -dependent

To determine whether *rmlBDAC* expression was RhlR-dependent, we measured the expression of the *rmlB-lacZ* fusion encoded on plasmid pRLM-P1 in the PAO1 Δ *rhlR* mutant. We found that in this mutant the *rmlBDAC* operon was still expressed at a constitutive level throughout the growth curve, but that the induction of its expression at the beginning of the stationary phase was lost (Fig. 1a). The analysis of the *rmlBDAC* transcriptional start sites in the PAO1 Δ *rhlR* mutant showed that the P2 promoter was dependent on RhlR activity (Fig. 2a). These results suggest that the induction of the expression of the *rmlBDAC* operon in early stationary phase is dependent on RhlR through its activation of the P2 promoter.

Promoters that contain 18 bp between the -10 and -35 sequences for the recognition of RNAP have been shown in *E. coli* to be preferentially transcribed by RNAP containing a σ^S subunit (Typas & Hengge, 2006). To determine whether P2 expression was transcribed by RNAP containing this alternative sigma subunit we determined the

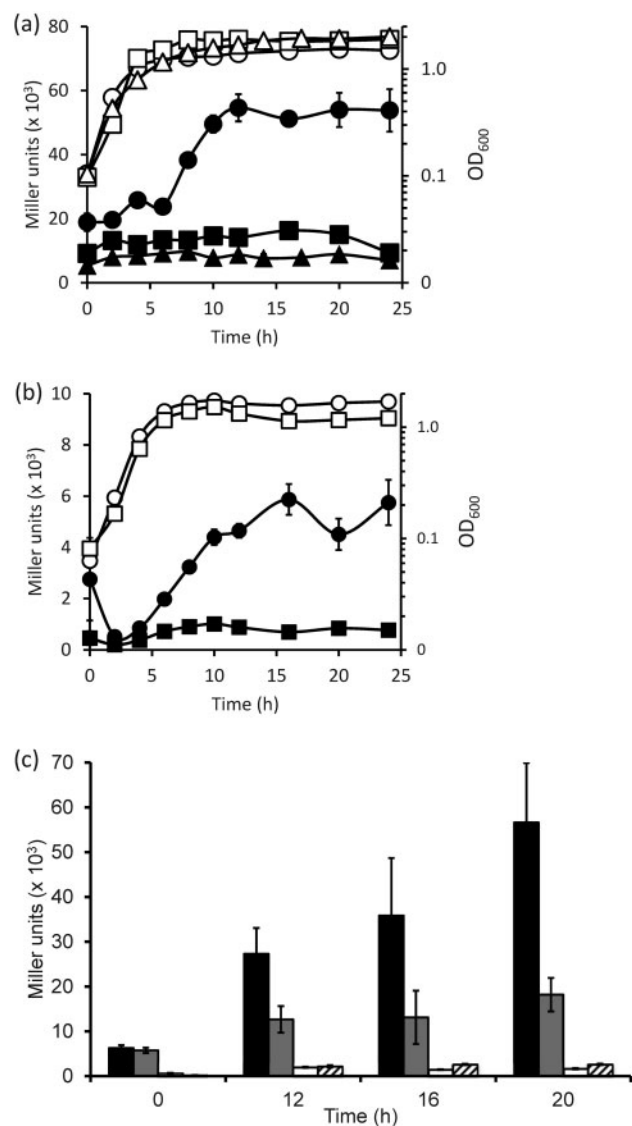


Fig. 1. Kinetics of *rmlBDAC* operon expression during growth of *P. aeruginosa* PAO1 and its mutant derivatives cultured on PPGAS medium. (a, b) Results obtained with plasmids pRML-P1 and pRML-3, expressed in the PAO1 wild-type strain and its mutant derivatives. Open symbols, OD₆₀₀ values; closed symbols, β -galactosidase activity. Circles, PAO1 wild-type strain; squares, *rhlR* mutant derivative (PAO1 Δ *rhlR*); triangles, PAO1 *rpoS* mutant PAS1. (c) Expression of plasmid pRML-P1 and its mutant derivatives pRML-P1(AA) and pRML-P1(CC) in *P. aeruginosa* strains at different time points. Black bars, plasmid pRML-P1 expressed in PAO1; grey bars, plasmid pRML-P1(AA), which inactivates the RhlR-binding site in the wild-type strain; white bars, the same plasmid in the PAO1 Δ *rhlR* mutant; hatched bars, plasmid pRML-P1(CC), which carries mutations inactivating the -10 sequences of the P2 promoter on PAO1.

expression of the *rmlB-lacZ* fusion encoded in plasmid pRML-P1 in a PAO1-derived *rpoS* mutant (PAS1, Table 1). We found that the kinetics of *rmlBDAC* expression were

very similar in the PAS1 (*rpoS* mutant) and PAO1 Δ *rhlR* mutants (Fig. 1a), and that a P2 transcriptional start site could not be detected in either mutant (Fig. 2a). These results show that P2 promoter expression is both RhlR- and RpoS-dependent. It is possible that we were unable to detect the residual expression of the P2 promoter in exponential phase in the PAS1 and PAO1 Δ *rhlR* mutants using primer extension analysis.

Identification of the *rml* box as an RhlR-specific binding site (*rhl* box)

The data regarding the RhlR-dependent expression of the P2 promoter suggest that the *rml* box is functional, since it is positioned in the typical place where this transcriptional regulator binds to promoter sequences (-44.5 nt from the transcription start site) (Fig. 2b). To test this hypothesis we constructed a *lacZ* transcriptional fusion which started immediately upstream of the *rmlB-las* box (pRML-3, Table 1), eliminating 494 bp from the 885 bp insert of plasmid pRML-P1. The *lacZ* fusion encoded on plasmid pRML-3 showed the same pattern of expression as that encoded on plasmid pRML-P1 in PAO1 and its *rhlR* mutant derivative, albeit at a lower level (Fig. 1b), showing that the insert in this plasmid contains the sequences required for RhlR-dependent expression.

To further confirm the functionality of the *rml* box for RhlR binding and P2 promoter activation we used several different strategies.

First we constructed an *rml* box mutant derivative of plasmid pRML-P1, changing the CG to AA at positions 3 and 4 of the box [plasmid pRML-P1(AA), Table 1], and found that RhlR-dependent induction of the *lacZ* fusion encoded on this plasmid was completely abolished (Fig. 1c), suggesting that this sequence is functional for RhlR binding and activation of *rmlBDAC* transcription from the P2 promoter.

To determine RhlR binding to the *rml* box and to further confirm its ability to activate transcription from the P2 promoter, we measured the expression of different *lacZ* fusions in an *E. coli* background. The functionality of the *rml* box for RhlR binding *in vivo* was determined using an artificial *lacZ* fusion inserted in the *E. coli* MC4100 chromosome. This artificial *lacZ* fusion was constructed by inserting the 19 nt sequence of this putative RhlR-binding site (*rml* box, Table 2) between -10 and -35 RNAP consensus binding sequences. Using this construct we were able to measure the binding of a protein to the DNA sequence between the RNAP binding sequences by the repression of *lacZ* expression. In this experiment we used as a positive control the *las* box of *rhlA*, which is preferentially bound by RhlR, both in the presence and in the absence of C₄-HSL [in the former case RhlR activates transcription, while in the latter case it acts as a repressor (Medina *et al.*, 2003b)]. As a negative control for RhlR binding and control of binding specificity, we used the

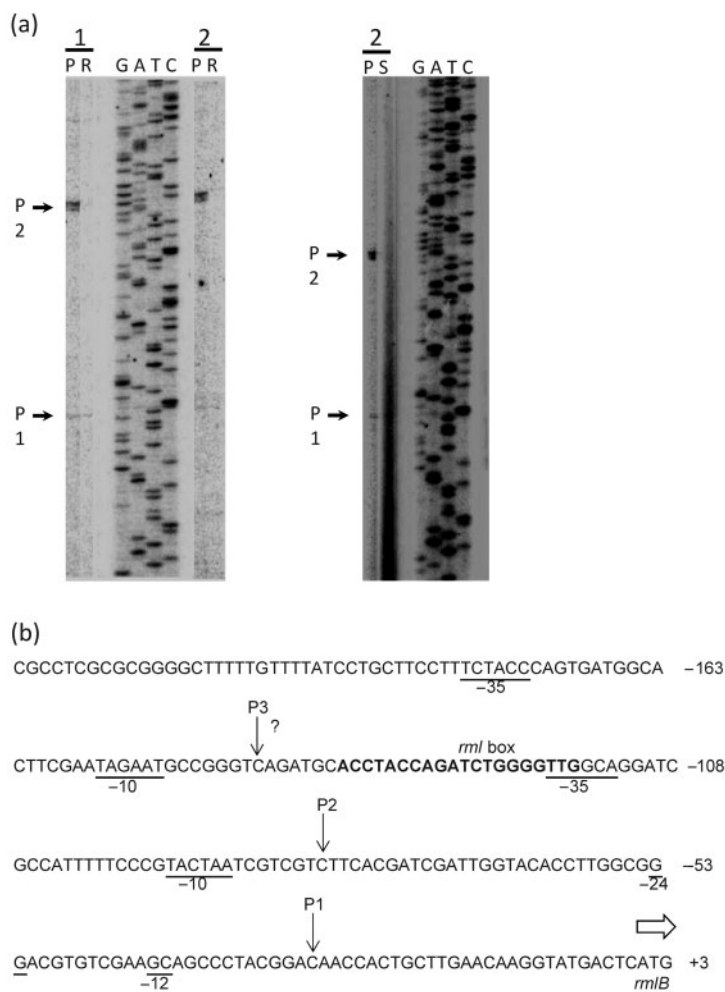


Fig. 2. Characterization of the transcriptional arrangement of the *P. aeruginosa* PAO1 *rmlBDAC* operon. (a) Identification of the transcription start sites by primer extension analysis of the *rmlBDAC* upstream region in the PAO1 (P) genetic background and in its *rhlR* (R) and *rpoS* (S) derived mutants (PAO1 Δ *rhlR* and PAS1, respectively, Table 1). Lanes: 1, RNA purified from cells in the exponential phase (OD₆₀₀ 0.6); 2, RNA start sites obtained with RNA purified from PAO1 cells in early stationary phase (OD₆₀₀ 1.5). The DNA ladder used to obtain the DNA sequence is shown. (b) Schematic representation of the *rmlBDAC* promoter region, showing the three promoters and the *rml* box (bold type) described in this work. The transcription start sites (P1, P2 and P3) are shown by arrows and the corresponding RNAP recognition sequences (-10 and -35, or -12 and -24) are underlined. A question mark next to P3 denotes that this start site was not detected by primer extension and thus that its location is not certain.

DNA sequence of the *lasI* las box, which is specifically bound by LasR/3O-C₁₂-HSL (Schuster *et al.*, 2004b). The results obtained clearly showed that RhlR is able to bind to the *rml* box both in the presence and in the absence of C₄-HSL, as it does to the *rhlA* las box, and that LasR/3O-C₁₂-HSL is not able to bind to this sequence at a detectable level (Table 2).

The ability of LasR/3O-C₁₂-HSL to activate *rhlA* transcription in the *E. coli* background, albeit at a reduced level compared with the transcription of this gene by RhlR/C₄-HSL (Medina *et al.*, 2003c), shows that LasR is able to bind to this sequence to some extent. To determine whether the *rml* box was also recognized by LasR/3O-C₁₂-HSL to some extent, we expressed plasmid pMPRML-3, which contains the same insert as plasmid pRML-3, but in a different vector plasmid (Table 1, Fig. 3), in the *E. coli* background in the presence of plasmids encoding genes expressing either RhlR (pGMYC, Table 1) or LasR (pMT1, Table 1), and by adding their corresponding autoinducers. The results showed that RhlR/C₄-HSL activates *rmlB* transcription, while LasR/3O-C₁₂-HSL has no activity towards this promoter (Fig. 3).

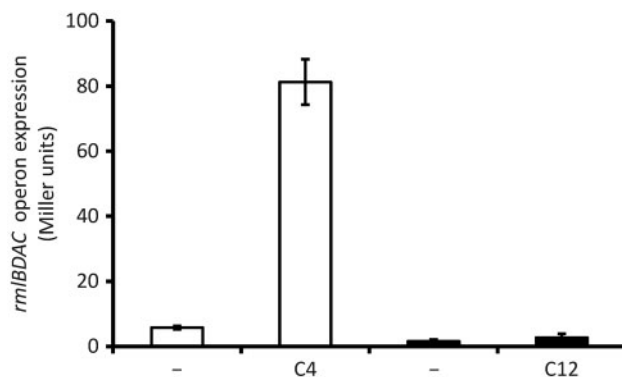


Fig. 3. Expression of the *rmlBDAC* operon in an *E. coli* background. White bars, plasmid pMPRML-3 in the presence of plasmid pGMYC encoding RhlR, with the addition of 10 μ M C₄-HSL (C4); black bars, pMT1 encoding LasR, with the addition of 3O-C₁₂-HSL (C12). -, No addition.

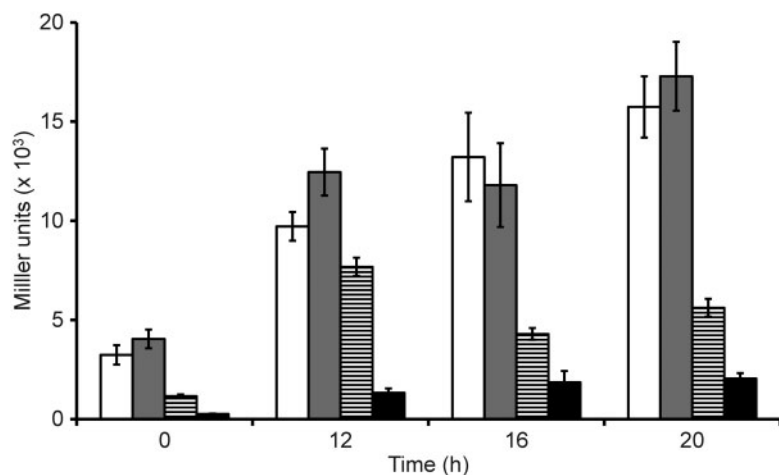


Fig. 4. The P3 promoter is only functional in the absence of the RhIR-dependent QSR. Data show the expression in the PAO1 background of plasmid pRML-2 (white bars), containing the complete *rmlB* promoter region, its mutant derivative pRLM-2(CC) with mutations that inactivate the -10 sequences of promoter P3 (grey bars), pRML-2 in a PAO1 Δ *rhIR* mutant background (hatched bars), and pRML-2(CC) in the same *rhIR*-deficient strain (black bars).

Taken together these results show that the *rmlBDAC* operon is specifically activated by RhIR/C₄-HSL and that LasR/3O-C₁₂-HSL does not recognize the *rml* box.

The P2 *rmlB* promoter shows some RhIR- and σ^S -independent expression

The expression of the *lacZ* fusion encoded on plasmid pRML-P1 in the PAO1 Δ *rhIR* mutant showed a high level of expression throughout the growth curve (Fig. 1a), which was similar to that shown by the *lacZ* fusion encoded on plasmid pRML-P1(AA) in this mutant background (Fig. 1c). To determine whether the basal level of expression, which was independent of RhIR, was dependent on the P2 promoter, we constructed a mutant in plasmid pRML-P1 that inactivated the -10 region of this promoter [pRML-P1(CC), Table 1]. This mutation reduced *rmlB::lacZ* expression in the PAO1 background to much lower levels than the mutation that inactivates the *rml* box (Fig. 1c). This result strongly suggests that the *rmlBDAC* P2 promoter contributes most of the expression of this operon and that its dependence on RhIR and σ^S for activation is not absolute.

The P3 start site contributes to *rmlBDAC* activation only under conditions where RhIR is not functional

In silico analysis of the *rmlB* upstream region revealed the presence of a putative promoter (P3, Fig. 2b) at approximately -140 nt from the translational start site (the putative -10 region of this promoter spans between -150 and -156 , and the -35 region between -171 and -176 , Fig. 2b). To test the functionality of this putative promoter we constructed a mutation to change the AA dinucleotide at positions -152 and -151 to CC, thus inactivating the putative -10 RNAP recognition sequence [plasmid pRML-2(CC), Table 1]. This mutation was constructed in plasmid pRML-2, which is a pRLM-P1 deletion derivative with a 550 bp insert containing the

whole 5' *rmlB* untranslated region and a truncated upstream tRNA gene (Table 1).

We found that the *lacZ* fusion encoded on plasmid pRML-2 showed a similar pattern of expression to that of pRML-P1 both in PAO1 and the PAO1 Δ *rhIR* mutant (Fig. 4), and that inactivation of the -10 sequence of promoter P3 had no effect on the wild-type background, although it considerably reduced *rmlB* expression in the PAO1 Δ *rhIR* mutant background (Fig. 4). The molecular basis for the repression of the P3 promoter in the wild-type strain was not determined.

Promoter P3 was not detected by primer extension analysis (Fig. 2a). This is the expected result for the wild-type strain PAO1, since P3 expression is very low if it is expressed at all (Fig. 4a). However we do not have an explanation for our inability to detect by primer extension analysis the RNA start site that corresponds to promoter P3 in the PAO1 Δ *rhIR* mutant. These results suggest that promoter P3 is important for the expression of the *rmlBDAC* operon under conditions where the QSR is not active. Under these circumstances the dTDP-L-rhamnose produced would be solely used for LPS synthesis.

In conclusion we have described how the *rmlBDAC* operon is expressed by three promoters, one of which (P2) is partially RhIR- and σ^S -dependent. This pattern of regulation permits the high basal expression of the genes that encode enzymes involved in dTDP-L-rhamnose synthesis, which is fundamental to the production of this activated sugar used as an LPS precursor, and also the coordinated induction of these genes with the RhIR-dependent expression of genes encoding enzymes responsible for rhamnolipid biosynthesis (RhIA, RhIB and RhIC).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (50201) and by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-Dirección

General Asuntos del Personal Académico (PAPIIT-DGAPA), UNAM (IN200707). This work represents M. A.-R.'s PhD thesis done in Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM. Oligonucleotides and automated sequencing were performed by the Unit for DNA Sequence and Synthesis of the Instituto de Biotecnología, UNAM. We acknowledge Miguel A. Ramírez from Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, for his participation in the *in silico* analysis of DNA sequences, Manuel Miranda, University of Texas at El Paso, for his help in the construction of mutants, and Humberto García Arellano for his help in expression experiments.

REFERENCES

- Bozue, J. A., Parthasarathy, N., Phillips, L. R., Cote, C. K., Fellows, P. F., Mendelson, I., Shafferman, A. & Friedlander, A. M. (2005). Construction of a rhamnose mutation in *Bacillus anthracis* affects adherence to macrophages but not virulence in guinea pigs. *Microb Pathog* **38**, 1–12.
- Cabrera-Valladares, N., Richardson, A.-P., Olvera, C., Treviño, L. G., Déziel, E., Lépine, F. & Soberón-Chávez, G. (2006). Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**, 187–194.
- Casadaban, M. J. (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**, 541–555.
- Croda-García, G., Grosso-Becerra, V., González-Valdez, A. A., Servín-González, L. & Soberón-Chávez, G. (2011). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*: role of the CRP orthologue Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhlR. *Microbiology* **157**, 2545–2555.
- de Kievit, T. R., Kakai, Y., Register, J. K., Pesci, E. C. & Iglewski, B. H. (2002). Role of the *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in *rhlI* regulation. *FEMS Microbiol Lett* **212**, 101–106.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003). *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**, 2005–2013.
- Engels-Deutsch, M., Pini, A., Yamashita, Y., Shibata, Y., Haikel, Y., Schöller-Guinard, M. & Klein, J.-P. (2003). Insertional inactivation of *pac* and *rmlB* genes reduces the release of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans* in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells. *Infect Immun* **71**, 5169–5177.
- Hancock, R. E. W. & Carey, A. M. (1979). Outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*: heat- and 2-mercaptoethanol-modifiable proteins. *J Bacteriol* **140**, 902–910.
- Kiratisin, P., Tucker, K. D. & Passador, L. (2002). LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. *J Bacteriol* **184**, 4912–4919.
- Lazdunski, A. M., Ventre, I. & Sturgis, J. N. (2004). Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **2**, 581–592.
- Ma, Y., Mills, J. A., Belisle, J. T., Vissa, V., Howell, M., Bowlin, K., Scherman, M. S. & McNeil, M. (1997). Determination of the pathway for rhamnose biosynthesis in mycobacteria: cloning, sequencing and expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding α -D-glucose-1-phosphate thymidyltransferase. *Microbiology* **143**, 937–945.
- Ma, Y., Stern, R. J., Scherman, M. S., Vissa, V. D., Yan, W., Jones, V. C., Zhang, F., Franzblau, S. G., Lewis, W. H. & McNeil, M. R. (2001). Drug targeting *Mycobacterium tuberculosis* cell wall synthesis: genetics of dTDP-rhamnose synthetic enzymes and development of a microtiter plate-based screen for inhibitors of conversion of dTDP-glucose to dTDP-rhamnose. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1407–1416.
- Marumo, K., Lindqvist, L., Verma, N., Weintraub, A., Reeves, P. R. & Lindberg, A. A. (1992). Enzymatic synthesis and isolation of thymidine diphosphate-6-deoxy-D-xylo-4-hexulose and thymidine diphosphate-L-rhamnose. Production using cloned gene products and separation by HPLC. *Eur J Biochem* **204**, 539–545.
- Medina, G., Juárez, K., Díaz, R. & Soberón-Chávez, G. (2003a). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* **149**, 3073–3081.
- Medina, G., Juárez, K. & Soberón-Chávez, G. (2003b). The *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* operon is not expressed during the logarithmic phase of growth even in the presence of its activator RhlR and the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone. *J Bacteriol* **185**, 377–380.
- Medina, G., Juárez, K., Valderrama, B. & Soberón-Chávez, G. (2003c). Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J Bacteriol* **185**, 5976–5983.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*, pp. 431–435. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Müller, M. M. & Hausmann, R. (2011). Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**, 251–264.
- Ochsner, U. A., Fiechter, A. & Reiser, J. (1994). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem* **269**, 19787–19795.
- Pearson, J. P., Pesci, E. C. & Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* **179**, 5756–5767.
- Rahim, R., Burrows, L. L., Monteiro, M. A., Perry, M. B. & Lam, J. S. (2000). Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **146**, 2803–2814.
- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S. & Soberón-Chávez, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* **40**, 708–718.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schuster, M. & Greenberg, E. P. (2007). Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics* **8**, 287. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/287>
- Schuster, M., Lostroh, C. P., Ogi, T. & Greenberg, E. P. (2003). Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**, 2066–2079.
- Schuster, M., Hawkins, A. C., Harwood, C. S. & Greenberg, E. P. (2004a). The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* **51**, 973–985.
- Schuster, M., Urbanowski, M. L. & Greenberg, E. P. (2004b). Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15833–15839.
- Simons, R. W., Houman, F. & Kleckner, N. (1987). Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**, 85–96.

- Soberón-Chávez, G., Aguirre-Ramírez, M. & Ordóñez, L. G. (2005a).** Is *Pseudomonas aeruginosa* only “sensing quorum”? *Crit Rev Microbiol* **31**, 171–182.
- Soberón-Chávez, G., Lépine, F. & Déziel, E. (2005b).** Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**, 718–725.
- Spaink, H., Okker, R., Wijffelman, C., Pees, E. & Lugtenberg, B. (1987).** Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1Jl. *Plant Mol Biol* **9**, 27–39.
- Typas, A. & Hengge, R. (2006).** Role of the spacer between the –35 and –10 regions in σ^S promoter selectivity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **59**, 1037–1051.
- von Bodman, S. B., Willey, J. M. & Diggle, S. P. (2008).** Cell-cell communication in bacteria: united we stand. *J Bacteriol* **190**, 4377–4391.
- Whiteley, M. & Greenberg, E. P. (2001).** Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J Bacteriol* **183**, 5529–5534.
- Whiteley, M., Lee, K. M. & Greenberg, E. P. (1999).** Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13904–13909.
- Williams, P. & Cámara, M. (2009).** Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* **12**, 182–191.
- Winzer, K., Falconer, C., Garber, N. C., Diggle, S. P., Cámara, M. & Williams, P. (2000).** The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* **182**, 6401–6411.
- Yang, H., Matewish, M., Loubens, I., Storey, D. G., Lam, J. S. & Jin, S. (2000).** *migA*, a quorum-responsive gene of *Pseudomonas aeruginosa*, is highly expressed in the cystic fibrosis lung environment and modifies low-molecular-mass lipopolysaccharide. *Microbiology* **146**, 2509–2519.
- Zhang, Y. & Miller, R. M. (1992).** Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* **58**, 3276–3282.
- Zulianello, L., Canard, C., Köhler, T., Caille, D., Lacroix, J.-S. & Meda, P. (2006).** Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **74**, 3134–3147.

Edited by: I. K. Toth