



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“REGULACION POR TEMPERATURA DE LA RESPUESTA SENSORA DE
QUÓRUM DE *Pseudomonas aeruginosa*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

P R E S E N T A

Maria Victoria Grosso Becerra

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Gloria Soberón-Chávez, Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Enrique Merino-Pérez, Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Jose Luis Puente-García, Instituto de Biotecnología, UNAM

MÉXICO, D. F.

Enero, 2016



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.

La presente tesis fue realizada en el grupo de investigación de la Dra. Gloria Soberón Chávez, perteneciente al Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (IIB-UNAM), ubicado en la ciudad de México, D.F.

Gracias a los apoyos económicos otorgados por Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología-CONACyT (beca para Estudios de Doctorado número 221575) y al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal-ICyTDF (Becas Mujeres ICyTDF 2010).

JURADOS DE EXAMEN

Dra. Esperanza Martínez Romero

Dra. Bertha González Pedrajo

Dr. Dimitris Georgellis

Dr. Sebastian Poggio Ghilarducci

Dr. Gabriel Guarneros Peña

A mi familia

A todos mis maestros

A mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Al término de esta etapa de mi formación académica, quiero decir GRACIAS a todas las personas que con su valiosa contribución la han hecho posible.

En primer lugar, agradezco a mi Tutora y Directora de esta Tesis, la Dra. Gloria Soberón Chávez, el haberme aceptado en su grupo de investigación y la confianza depositada en mi y en mi trabajo a lo largo de todos estos años. Gracias por su generosidad y ayuda ilimitada para que mi permanencia en el grupo fuera posible; por el ánimo infundido en cada parte de este trabajo y por ser tan paciente conmigo. Gracias por cada enseñanza que recibí estando bajo su supervisión.

De manera muy especial, agradezco a los miembros de mi Comité Tutorial, los Dres. Enrique Merino Pérez y José Luis Puente García. Sus valiosas críticas y consejos, al igual que sus acertados aportes y discusiones en cada etapa de este proceso, contribuyeron significativamente a mejorar mi desempeño en el doctorado.

Me gustaría también agradecer al Dr. Luis Servín González, su apoyo, amabilidad y disposición en compartir sus conocimientos y los recursos disponibles para facilitar mi trabajo.

A la Dra. Guadalupe Espín Ocampo, al Dr. Enrique Merino Pérez y al Dr. Alejandro Alagón Cano por permitirme usar sus laboratorios, al igual que sus recursos, en una fase de ejecución de este proyecto. Agradezco de manera especial a la Biol. Soledad Moreno su asesoría con los experimentos de PCR en tiempo real y al M.C. Alejandro Olvera Rodríguez su colaboración en la producción de anticuerpos policlonales. Dirijo también mi agradecimiento al Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, especialmente a la M.V.z. Elizabeth Mata por las facilidades en la obtención de recursos y uso de sus instalaciones.

A los miembros del Jurado de Examen, Dra. Esperanza Martínez Romero, Dra. Bertha González Pedrajo, Dr. Dimitris Georgellis, Dr. Sebastian Poggio Ghilarducci y Dr. Gabriel Guarneros Peña, agradezco todo el esfuerzo y tiempo que tomaron para leer este texto y por todas y cada una las correcciones y sugerencias, encaminadas a mejorar este escrito.

Gracias también a todos los Tutores, Académicos y Compañeros Estudiantes del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por toda la generosa ayuda que siempre recibí de ustedes.

Mi agradecimiento a TODOS mis compañeros del laboratorio de la Dra. Gloria Soberón Chávez, especialmente a la Dra. Marisela Aguirre y a la M.C. Abigail González Valdez, por todo el invaluable apoyo técnico recibido, por su amistad y soporte en todo este proceso. A

Gabriel Ponce y Estefanía Morales, por su ayuda incondicional, amistad y enseñanzas. Les deseo lo mejor en sus caminos.

A la Dra. Lidia Riaño Umbarila, mi amiga de siempre y maestra de tenacidad y perseverancia. GRACIAS por ser mi ancla durante mi larga estancia en México, por toda la paciencia y la ayuda constante que recibí. Al Dr. Humberto Flores Soto, gracias por su amabilidad e incondicional apoyo.

A la Familia Carmona-Manjarrez y Carmona-Kinney, gracias infinitas por el permitirme vivir con ustedes, acogerme como un miembro más de su familia y hacerme sentir en casa durante mi larga estancia en México.

A mis amigas y compañeras (Irene, Maru, Lorena y Yubi) del taller de Suspiros en Papel, con quienes aprendí a hacer cosas extraordinarias con mis manos y a compartir momentos de trabajo duro y grandes satisfacciones. Gracias por todo el apoyo incondicional, su comprensión y por permitirme también, hacer parte de su equipo durante todo este tiempo.

Gracias Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT y al Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal-ICyTDF, por la concesión del apoyo financiero durante mis estudios.

Por último pero no menos importante, me gustaría expresar mi profunda gratitud a mi FAMILIA, especialmente a mi Madre, Hermanas y Sobrinos, por su apoyo y ánimos, especialmente durante los tiempos difíciles.

INDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2 El genoma de <i>P. aeruginosa</i>	2
1.3 Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	4
1.3.1 Factores de virulencia asociados a la célula	4
1.3.2 Factores de virulencia extracelulares	7
1.4 La comunicación célula-célula y el quórum sensing	13
1.5 El sistema sensor de quórum en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
1.6 Factores ambientales y la expresión de factores de virulencia	23
1.6.1 Termosensores en bacterias	24
1.6.2 Termómetros de ARN	28
2. ANTECEDENTES	42
3. OBJETIVOS	44
3.1 Objetivo general	44
3.2 Objetivos particulares	44
4. ARTÍCULOS PUBLICADOS	45
5. DISCUSIÓN GENERAL	46
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMEN

La mayoría de los patógenos bacterianos regulan la producción de sus factores de virulencia por la temperatura, expresándolos únicamente a 37°C. Esta termorregulación, se logra a través de estructuras secundarias que se forman en la región 5' no traducible (5'-UTR) de los ARNm, las cuales a bajas temperaturas, secuestran la secuencia de unión al ribosoma (SD) y modulan el inicio de la traducción de los genes ubicados corriente abajo. El aumento de la temperatura y los cambios que suceden en la conformación de la estructura, liberan el SD y lo hacen accesible a los ribosomas. Dentro de los termómetros de ARN (ARNT), el elemento ROSE (repression of heat shock expression) es el mejor caracterizado y su presencia sólo se ha reportado en las 5'-UTR de los ARNm de los genes que codifican para las proteínas pequeñas de la respuesta al choque por calor (HSR) de diferentes γ -proteobacterias. *Pseudomonas aeruginosa* es un importante patógeno nosocomial y la expresión de sus factores de virulencia, está regulada por el sistema sensor de quórum (QS). En el presente trabajo, se demostró que la producción de todos los factores de virulencia que dependen de RhlR y solo una parte de los activados por LasR, se inducen a 37°C. Así mismo, se reportó el primer ejemplo en el que un elemento ROSE termorregula la expresión de genes no relacionados con HSR, sino involucrados en la producción de ramnolípidos (el operón *rhlAB*), un factor de virulencia. Este ARNT, también afecta la expresión del gen *rhlR* que codifica para el regulador de QS, RhlR el cual, bajo ciertas condiciones, se transcribe desde el promotor de *rhlA*, formando un circuito de autorregulación positivo. Las evidencias sugieren que la termorregulación de *rhlR* es consecuencia de un efecto polar de *rhlA* sobre la transcripción de *rhlB* y *rhlR*. Un segundo ARNT presente en la 5'-UTR del gen *lasI*, reduce su expresión a bajas temperaturas, pero su efecto sobre el regulón LasR es limitado. A través de los análisis de transcriptoma y PCR cuantitativo en tiempo real, se demostró que estos ARNT son los principales mecanismos de la termorregulación de la respuesta QS en *P. aeruginosa*.

ABSTRACT

Several bacterial pathogens regulate the production of virulence factors by temperature expressing them only at 37°C. This thermoregulation is commonly achieved by mRNA structures formed in the 5' untranslated region (UTR) that module translation initiation of downstream genes by masking Shine-Dalgarno sequences at low temperatures. When the temperature increases the RNA structure is no longer stable and ribosomes have access to their binding sites in the mRNA. One of the best characterized RNA-thermometers is the ROSE-element that has only been reported to be located at the 5'UTR of small heat shock mRNAs of several gamma-proteobacteria. *Pseudomonas aeruginosa* is an important nosocomial pathogen and the expression of its virulence associated traits is regulated by quorum-sensing (QS). Here we report that the production of all *P. aeruginosa* RhlR-dependent virulence factors, but only a fraction of those activated by LasR, are induced at 37°C. We show the first example of a ROSE-element that thermoregulates the expression of genes not related to heat shock, but involved in rhamnolipids production (*rhlAB* operon), a virulence associated trait. This RNA-thermometer also affects the expression of the downstream gene coding for the QS regulator RhlR since under some conditions *rhlR* expression is transcribed from the *rhlA* promoter, and a positive autoregulatory loop is formed. We show that the RhlR concentration is considerably higher at 37°C than at 30°C, and provide evidence suggesting that *rhlR* thermoregulation is achieved by polarity of *rhlA* translation on *rhlB* and *rhlR* transcription. A second RNA-thermometer at the 5'UTR *lasI* causes a reduced expression at lower temperatures, but with a limited effect over the Las-regulon. Using transcriptomic analysis and quantitative real time PCR we show that these RNA thermometers are the main mechanism of thermoregulation of *P. aeruginosa* QS.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	5
Figura 2. Regulación de la bioluminiscencia en <i>V. fischeri</i> , prototipo de la respuesta QS	15
Figura 3. Esquema de la regulación de la respuesta QS en <i>P. aeruginosa</i>	19
Figura 4. Mecanismo de acción de las estructuras que actúan como termómetros de ARN	30
Figura 5. Estructura de tallo-asa que responde a la temperatura en el elemento ROSE de <i>B. japonicum</i> .	31
Tabla 1. Termómetros de ARN (ARNT) que participan en la regulación de los factores de virulencia en diferentes bacterias patógenas	39

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*), una bacteria Gram negativa y perteneciente a las γ -proteobacterias, es un microorganismo adaptable y cosmopolita que puede colonizar ecosistemas terrestres y acuáticos; se puede aislar de ambientes inertes como aguas, sedimentos, campos petroleros o asociada a plantas y sus rizósferas y de animales, inclusive humanos^{1,2}. Posee una gran versatilidad metabólica que le permite utilizar diversos compuestos como fuente de carbono, respirar bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas y metabolizar antibióticos, detergentes, metales pesados y solventes³. Hasta la fecha, *P. aeruginosa* es un modelo ampliamente investigado tanto por su gran potencial biotecnológico en el área de la biorremediación, como por su importancia médica por ser una bacteria con alta incidencia nosocomial.

Desde el punto de vista médico, *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista y puede infectar otros organismos incluyendo plantas, nemátodos, insectos, peces y mamíferos^{4,7,17}. En humanos sanos, ocasionalmente es parte de la biota normal y se puede aislar de la piel, la mucosa nasal, la garganta, heces, y pocas veces causa infecciones. Sin embargo, en individuos inmunosuprimidos como los infectados con VIH, pacientes con cáncer o trasplantados, al igual que en aquellos con lesiones extensas o continuas del epitelio como quemados, dializados, pacientes internados en cuidados intensivos y aun en quienes usan lentes de contacto, genera serios procesos infecciosos y su tratamiento se dificulta debido a la resistencia de esta bacteria a antibióticos y a agentes desinfectantes⁸⁻¹². Por otro lado, la persistencia de *P. aeruginosa* en ambientes hospitalarios, se asocia con la capacidad de sobrevivir con un mínimo de requerimientos nutricionales, de tolerar una variedad de condiciones físicas y a su habilidad para adherirse y permanecer en superficies de dispositivos como sondas, catéteres, equipos de terapia respiratoria, e instrumental médico, formando en ellos una capa o biopelícula que resiste los procesos de eliminación¹³.

También, esta bacteria es considerada el principal causante de la disminución en la expectativa de vida entre los enfermos de fibrosis quística (FQ)¹⁴. La FQ es el padecimiento autosómico recesivo más frecuente en la población caucásica y es ocasionado por mutaciones en el gen *cftr*, el cual codifica para una proteína que funciona como un canal de cloro o CFTR

(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). La pérdida de la función de esta proteína, causa un defecto en el transporte de electrólitos en la membrana apical de las células epiteliales, alterando la función secretoria en diferentes órganos y tejidos¹⁴. La inflamación crónica del tracto respiratorio, es la manifestación clínica más grave en esta enfermedad debido a secreciones mucosas anormalmente espesas y a las infecciones recurrentes por microorganismos oportunistas como *P. aeruginosa* entre otros¹⁵.

1.2 El genoma de *P. aeruginosa*

Acorde con la gran versatilidad y adaptabilidad que hacen de *P. aeruginosa* un organismo ambiental ubicuo y un excelente patógeno oportunista, está la extensión y complejidad de su genoma. El primer genoma secuenciado y liberado en el año 2000, corresponde a la cepa de *P. aeruginosa* PAOI, un aislado proveniente de una otitis y ampliamente utilizado en la mayoría de los trabajos de investigación¹⁶.

Entre los patógenos humanos, el genoma de *P. aeruginosa* es uno de los más grandes, su tamaño varía entre 5.5 y 7 millones de pares de bases (Mpb); tiene un alto contenido de G+C (66%) y por predicción *in silico*, entre 5570 y 6200 marcos abiertos de lectura (ORFs); de estos, alrededor del 32% no tiene homología alguna con secuencias reportadas^{16,64}. Contrario a lo que sucede con otras especies bacterianas, cuyos extensos genomas son consecuencia de eventos de duplicación génica²⁶², el de *P. aeruginosa*, posee una elevada diversidad genética y funcional; esto incluye un gran número de genes que codifican proteínas de membrana externa, involucradas en la adhesión, motilidad, transporte o bombeo de antibióticos y exportación de factores de virulencia, así como sistemas de dos componentes¹⁶. Además, su extraordinaria versatilidad para utilizar diversos compuestos, se atribuye a un considerable número de genes que codifican para sistemas de transporte y enzimas implicadas en la absorción de nutrientes y su metabolismo. *P. aeruginosa* tiene una de las mayores proporciones de genes reguladores (9.4%), que incluyen factores transcripcionales y proteínas reguladoras de sistemas de dos componentes¹⁶; y al menos el 6% de su genoma, está regulado por la respuesta de QS¹⁰⁸.

Hasta la fecha, 73 genomas de aislamientos de esta bacteria, se han depositado de forma completa o parcial, en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology

Information). El incremento en la disponibilidad de múltiples secuencias de genomas, ha facilitado los estudios de genómica comparativa de *P. aeruginosa* y ha permitido la definición de un genoma central o “core”, el cual representa aproximadamente el 90% del genoma total de esta bacteria y está presente en casi todas las cepas; y un genoma accesorio, porciones de secuencias de ADN de longitud variable adquiridas por transferencia horizontal y presentes en algunas y ausente en otras cepas de *P. aeruginosa*^{18,64}.

En el genoma central se encuentran codificados los factores de virulencia y la alta conservación de los mismos (97%), entre los diferentes aislados sin importar su origen, demuestra el potencial de todas las cepas para ser patógenas y el requerimiento de los mismos para sobrevivir en el ambiente. Así mismo, en esta porción del genoma, se encuentran componentes importantes del mantenimiento y metabolismo central de *P. aeruginosa*, entre otros⁶⁴.

Respecto del genoma accesorio, las porciones de ADN que lo componen, referidas como islas (>10Kpb) o isletas (<10Kpb) de patogenicidad y dispersas en regiones llamadas de plasticidad genómica (RGP), contribuyen a la evolución del genoma de *P. aeruginosa* y sus características, tales como su relativo bajo contenido G+C (61%), dan cuenta de su adquisición reciente¹⁹. Los principales componentes son elementos integrativos y conjugativos, islas de reemplazo, profagos, elementos similares a fagos, secuencias de inserción e integrones. Además, los plásmidos presentes en algunas cepas de *P. aeruginosa* son considerados como parte del genoma accesorio^{18,19}. La importancia que tiene el genoma accesorio para algunas cepas de *P. aeruginosa* reside en la obtención de fenotipos específicos, los cuales son una ventaja bajo ciertas condiciones selectivas, como por ejemplo, ambientes con metales pesados o compuestos orgánicos tóxicos. Por otro lado, cepas provenientes de ambientes hospitalarios poseen en esta porción del genoma, genes adquiridos para resistencia a antibióticos, contribuyendo a la multirresistencia de este patógeno y ORFs que codifican para proteínas con homología para factores de virulencia, no descritos previamente en *P. aeruginosa*¹⁸. Entre las principales islas de patogenicidad de *P. aeruginosa*, PAPI-1 y PAPI-2, codifican para múltiples determinantes de virulencia, necesarios en la infección de modelos animales y plantas; particularmente la PAPI-2 y sus islas relacionadas, contienen el gen que codifica para la citotoxina ExoU, una proteína efectora asociada al incremento en la virulencia en humanos¹⁹.

1.3 Factores de virulencia de *P. aeruginosa*

Los factores de virulencia son estructuras o mecanismos que contribuyen al potencial de infección por parte de un patógeno. Un ejemplo de estas estructuras son las cápsulas, los flagelos, el pili o los sistemas de secreción tipo III (SST3), mientras que los mecanismos, involucran la producción de exotoxinas, moléculas para la captación de hierro, la evasión del sistema inmune o la translocación o ruptura de las membranas del hospedero, entre otras ²⁰.

P. aeruginosa continúa siendo un problema importante de salud y evitar la exposición a esta bacteria es casi imposible debido a su ubicuidad en la naturaleza y al contacto con elementos de la vida cotidiana, los cuales son también reservorios de la misma. Dos elementos claves contribuyen a la patogénesis de *P. aeruginosa*: el estado inmunológico de su hospedero, por lo cual es considerado un patógeno oportunista y a las características propias de la bacteria, ya que produce una gran variedad de factores de virulencia tanto extracelulares como asociados a la célula²¹ (Figura 1).

Es importante mencionar que la patogénesis de *P. aeruginosa* no se atribuye a un único factor de virulencia, sino que la precisa interrelación de sus múltiples factores, le permiten la adherencia y el establecimiento eficiente; mediante la destrucción de tejidos, la invasión y la diseminación a través del sistema vascular, así como la activación de la respuesta inflamatoria tanto a nivel local como sistémica ^{20,21}.

1.3.1 Factores de virulencia asociados a la célula

La primera etapa de un proceso infeccioso, es la colonización de la superficie del epitelio. Tal como lo hacen otras bacterias, *P. aeruginosa* utiliza adhesinas específicas para dar inicio al contacto con una superficie biológica. Los factores de virulencia asociados a la célula son: el flagelo, el pili tipo IV, el alginato, el lipolisacárido (LPS) y las lectinas ²⁰.

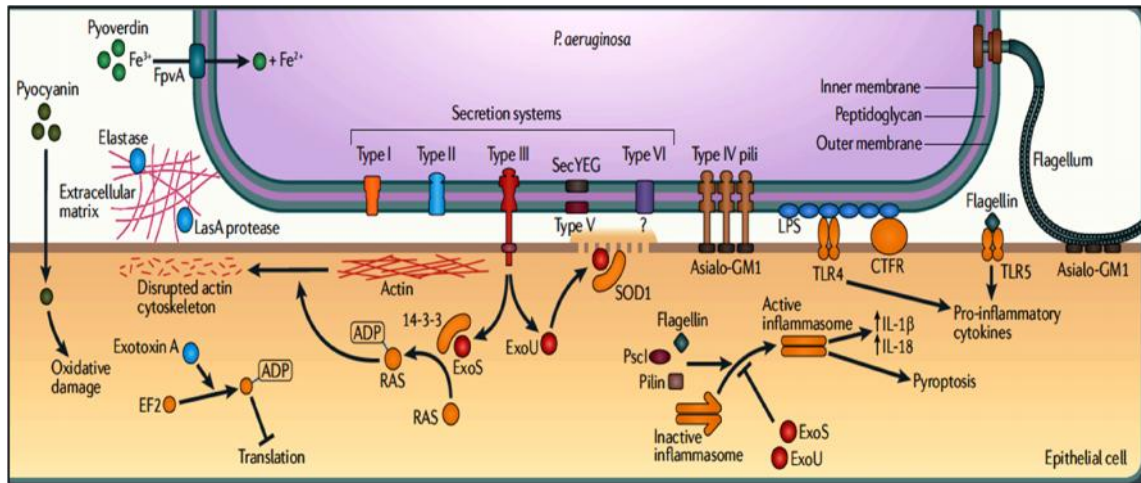


Figura 1. Factores de virulencia de *P. aeruginosa*. Efectos de los principales factores de virulencia que están asociados a la célula (el flagelo, el pili IV y el LPS), así como los producidos y secretados al exterior (elastatas, piocianina, pioverdina y las proteínas efectoras secretadas por el SST3). Adaptado de Hauser, A & Ozer, E. A (2011) *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Rev Microbiol* (9):3.

El flagelo

Cada célula de *P. aeruginosa* posee un único flagelo y varios pilis tipo IV, los cuales son más cortos que el flagelo. Ambas estructuras, además de servir como adhesinas, son los principales medios de movilidad celular y pueden dar inicio a una respuesta inflamatoria^{20,22}.

Durante la infección, el flagelo tiene un papel crítico en la patogénesis mediante la captura y adherencia a las células epiteliales a través de la unión a un componente de la membrana, el glicolípido asialo-gangliósido M1 (aGMI). También y asociada a su alta capacidad inmunogénica, *P. aeruginosa* se puede adaptar en el curso de infecciones crónicas, mediante la selección de mutantes carentes de flagelo para evadir las defensas del huésped. Estas mutantes, no son patógenas en modelos animales²².

El pili tipo IV

El pili tipo IV, es el filamento más pequeño de las estructuras asociadas a la membrana de *P. aeruginosa*. Son probablemente las más importantes adhesinas y participan en la movilidad celular llamada “twitching” o dispersión en superficies sólidas e hidratadas, debido a las propiedades retráctiles de los pilis²³. Esta característica, le facilita la rápida colonización de las vías respiratorias. Al igual que el flagelo, el pili es crucial en la fase de adhesión en la colonización a través de la unión de aGMI de las membranas celulares del epitelio²⁴. El pili,

también está involucrado en la formación de las biopelículas y puede contribuir a la agregación para formar microcolonias las cuales ofrecen la protección tanto del sistema inmunitario como de los antibióticos. Además de los pilis, *P. aeruginosa* posee tres grupo de fimbrias tipo I conocidas como CupA, CupB y CupC. Solo CupA ha demostrado ser importante en la adherencia a superficies abióticas para la formación de biopelículas y la autoagregación de las variantes de colonia pequeña o SCV (Small Colony Variants)²⁵.

El alginato

El alginato es un exopolisacárido lineal, conformado por unidades poliméricas y repetidas de ácido manurónico y glucorónico. Es producido por *P. aeruginosa*, particularmente por aislados clínicos mutantes en el factor anti-sigma MucA; esta mutación deriva en un fenotipo mucoide el cual es común en los pulmones de pacientes con FQ en el transcurso de sus infecciones²⁶. La alteración en la producción de este polímero, ofrece ventajas a la célula ya que la protege de la fagocitosis, los antibióticos y atenúa la respuesta inmune del hospedero²⁷. Al igual que el LPS, funciona como adhesina anclando a *P. aeruginosa* al epitelio respiratorio colonizado y contrario a lo que se consideraba, no tiene un papel en el desarrollo ni en la estructura de las biopelículas²⁸.

El lipolisacárido (LPS)

Otro factor de virulencia importante de *P. aeruginosa* es el LPS, un glicolípido complejo y el principal componente de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. La variación en las cadenas del polisacárido o antígeno O, son la base de la identificación antigénica de los 20 serotipos existentes de *P. aeruginosa*. Así mismo, el LPS constituye una barrera física que protege a la bacteria de las defensas del huésped, media la interacción directa con receptores de las células y los antibióticos. Por ser una endotoxina, es un potente señalizador en los procesos de antigenicidad y respuesta pro-inflamatoria, particularmente inducidas por el lípido A²⁹.

Lectinas

Las lectinas son proteínas que reconocen y se unen, de manera reversible, a carbohidratos específicos. *P. aeruginosa* produce dos lectinas LecA (PA-IIL) y LecB (PA-IIIL), las cuales unen

galactosa y fucosa, respectivamente³⁰. Aunque en un inicio se detectó la presencia de estas dos proteínas en el citoplasma de *P. aeruginosa*, la mayor parte está presente en la membrana externa, lo cual sugiere su papel como adhesina y como factor de virulencia³¹. LecA tiene efectos citotóxicos sobre las células del epitelio respiratorio e induce un defecto en la permeabilidad del epitelio gástrico; este defecto aumenta la absorción de la Exotoxina A^{32,33}. También, se conoce la participación de LecB en la biogénesis del pili tipo IV y en la actividad de la Proteasa IV³⁴. Ambas lectinas, aunque no de forma simultánea, inhiben los movimientos ciliares del epitelio, un mecanismo de defensa pulmonar³⁵.

1.3.2 Factores de virulencia extracelulares

En el curso de una infección, los patógenos enfrentan ambientes hostiles dentro de los hospederos y por ello utilizan mecanismos para su supervivencia, la búsqueda de nutrientes y evitar la erradicación por el sistema inmune. La mayoría de estos mecanismos involucran un gran número de proteínas bacterianas o factores de virulencia, los cuales están en la superficie de las células o son secretadas en el espacio extracelular o son inyectadas en el citosol de la célula del huésped²⁰.

Las proteínas secretadas viajan a través del ambiente hidrofóbico de las membranas y son en su mayoría, moléculas de gran tamaño y naturaleza hidrofílica por lo que deben ser transportadas a través de canales acuosos o conductos que atraviesen la membrana. Estos conductos hacia el medio exterior, son llamados sistemas de secreción (SS) y tanto la composición como la naturaleza de estos complejos varían, pero están ampliamente conservados dentro de las bacterias Gram negativas³⁶. Hasta la fecha, se han descrito seis sistemas de secreción, desde tipo I hasta tipo VI (SST1-SST6) todos presentes en *P. aeruginosa*^{37,38}.

Factores de virulencia secretados por el SST1

Experimentalmente, se ha demostrado la existencia de dos SST1 en *P. aeruginosa*: el Apr, el cual está involucrado en la secreción de la proteasa alcalina AprA y de AprX, esta última de función desconocida; y un sistema requerido para la captación del hierro, el cual secreta la proteína HasAp (Heme acquisition system)^{39,40}.

La proteasa alcalina AprA, una metaloproteasa cuyos sustratos específicos no han sido claramente identificados, degrada los componentes del complemento, el interferón- γ (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral- (TNF-), ambas, citocinas importantes en la respuesta inmune. También hidroliza la fibrina y el fibrinógeno, lo cual causa un serio daño tisular⁴¹.

La proteína HasAp, es un hemóforo de la familia HasA, la cual puede unir los grupos hemo de diversas fuentes tales como la hemoglobina y los presenta a receptores específicos de la membrana externa para su internalización⁴².

Factores de virulencia secretados por el SST2

El SST2, es uno de los sistemas más versátiles conservado y usado por las bacterias Gram negativas para secretar proteínas extracelulares al exterior⁴³. Promueve la translocación a la membrana externa de exoproteínas multiméricas que ya fueron plegadas en el periplasma.

P. aeruginosa tiene dos SST2: el Xcp (extracelular protein) y el HxC. El primero, secreta la exotoxina A o Tox A, las elastasas Las A y Las B, la fosfolipasa C hemolítica y no hemolítica, la endopeptidasa lisina-específica o Proteasa IV, la lipasa Lip C y la fosfatasa alcalina o Pho A, entre otras. El segundo, es homólogo de Xcp y solo es funcional en condiciones de crecimiento limitantes en fosfato, secretando un único producto, la fosfatasa alcalina de bajo peso molecular, LapA⁴⁴.

La **exotoxina A** es una ADP-ribosil transferasa, cuyo principal efecto nocivo es la inactivación del factor de elongación 2 y posterior bloqueo de la síntesis de proteína, provocando así la muerte celular⁴⁵. Es considerado el principal factor de virulencia sistémico por su alta toxicidad, su actividad inmunosupresora, y participación en las infecciones de córnea, ya que cepas mutantes en esta toxina son rápidamente eliminadas en modelos de infección^{46,47}.

Las **elastasas A y B**, son metaloproteasas dependientes de zinc y actúan sobre un número de proteínas incluyendo la elastina, componente principal de los pulmones y los vasos sanguíneos⁴⁸. LasA, tiene una baja actividad elastolítica debido a su especificidad por degradar proteínas ricas en glicina, secuencias poco frecuentes en la elastina. Sin embargo, LasA aumenta la actividad elastolítica de proteasas tanto de *P. aeruginosa* (LasB) como del huésped (elastasa de leucocitos y de neutrófilos)⁴⁹. Aparte de su actividad elastolítica, posee actividad lítica contra *Staphylococcus aureus*, actividad incrementada a través de LasB y la

proteasa alcalina. Esta actividad puede representar una estrategia de defensa contra otras bacterias competidoras que colonizan los pulmones de los enfermos de FQ⁵⁰.

LasB además de degradar elastina, fibrina y colágeno, también es capaz de degradar componentes del sistema inmune, incluyendo citocinas y quimiocinas, péptidos antimicrobianos, inmunoglobulinas y factores del complemento⁵¹. Así mismo, la degradación de las proteínas surfactantes humanas SP-A y SP-B, las cuales tiene un importante papel en la respuesta inmune innata y en la regulación de los procesos inflamatorios, es un mecanismo de virulencia importante durante las infecciones crónicas en pacientes de FQ⁵². Se ha demostrado que mutantes en el gen *lasB*, son susceptibles a la fagocitosis y son menos virulentas⁵³.

En cuanto a las fosfolipasas C, *P. aeruginosa* produce dos: una hemolítica, cuya actividad patogénica no se ha demostrado aún y una hemolítica (PLH), cuyo efecto se ha evidenciado tanto en humanos como en modelos mamíferos, insectos y plantas^{54,55}. Los sustratos de la PLH son la fosfatidilcolina y la esfingomiélin, lípidos constituyentes de la membrana celular y del surfactante pulmonar. Suprime la respuesta de estallido respiratorio o “respuesta burst” de los neutrófilos, uno de los principales mecanismos de defensa de las células fagocíticas del sistema inmune contra las bacterias⁵⁶. Mutantes de *P. aeruginosa* en esta fosfolipasa, son menos virulentas en modelos animales, lo cual confirma su importancia como factor de virulencia⁵⁷.

La proteasa IV, es una serín endoproteasa secretada por la mayoría de aislados clínicos de *P. aeruginosa*⁵⁸. Degrada un amplio rango de proteínas de importancia biológica para el huésped tales como el fibrinógeno, el plasminógeno, la inmunoglobulina G (IgG) y los componentes del complemento 3 y C1q, todos pertenecientes al sistema inmune. Al igual que LasB, la proteasa IV degrada las proteínas surfactantes SP-A, SP-B y SP-D, afectando su función tensoactiva y de defensa⁵⁹. En enfermos de FQ con infecciones crónicas, esta enzima degrada lactoferrina y transferrina, proteínas que unen hierro y son parte del mecanismo de defensa del pulmón. También degrada caseína, elastina y decorina. Su producción está regulada por la disponibilidad de hierro a través del factor extra-citoplasmático PvdS que a su vez está regulado por Fur (*ferric uptake regulator*)⁶⁰.

En cuanto al papel en la virulencia de las lipasas LipA y LipC producidas por *P. aeruginosa*, se ha propuesto que junto con la PLH podrían degradar el dipalmitoil fosfatidilcolina, principal

lípidos del surfactante pulmonar y componente mayoritario de los fosfolípidos en los fluidos que recubren los alveólos. Así mismo, ambas proteínas inducen la liberación del ácido 12-hidroxi-eicosatetraenoico (12-HETE) de las plaquetas y de otros mediadores de la respuesta inflamatoria⁶¹.

Factores de virulencia secretados por el SST3

Este sistema de secreción es utilizado como un mecanismo para inyectar toxinas, llamadas efectores, dentro del citosol de las células y está presente en diferentes patógenos tales como *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Pseudomonas*⁶². Es necesario el contacto para permitir la translocación de dichos efectores a través de la membrana bacteriana hasta el citoplasma de las células eucariontes, mediante una estructura que se asemeja a una jeringa. Este aparato de secreción, es también denominado inyectisoma y se relaciona con el flagelo en términos de sus componentes así como de su arquitectura⁶². La actividad citotóxica de los efectores, altera la respuesta del sistema inmune y ocasiona daño y muerte celular⁶³.

La presencia de los genes que codifican para estos efectores puede variar de un aislado a otro, pero la presencia de *exoU* y *exoS* son mutuamente excluyentes. *exoS* solo está presente en las cepas PAO1 y LESB58, *exoU* es exclusiva de PA14 y está localizado en la isla de patogenicidad PAPI-2 y *exoT* y *exoY* están presentes en PAO1, PA14 y LESB58⁶⁴. Finalmente, la cepa *P. aeruginosa* PA7, un aislado no pulmonar y altamente resistente a antibióticos, no posee ninguno de los genes de los efectores ni los genes que codifican los componentes del SST3⁶⁵.

Exo S y Exo T son enzimas bifuncionales que incluyen actividad de proteína activadora de GTPasa (GAP) en el dominio N-terminal y actividad ADP-ribosiltransferasa (ADPRT) en el dominio C-terminal. La actividad de ADPRT de ExoS es diferente a la observada en la Exotoxina A, en cuanto a las proteínas eucariontes blanco y porque requiere la activación de una proteína eucarionte FAS (Factor Activating Exoenzyme S), perteneciente a la familia 14-3-3. Estas citotoxinas previenen la fagocitosis de *P. aeruginosa* mediante la re-organización del esqueleto de actina de los macrófagos o células epiteliales, previenen la producción de interleucinas por los macrófagos y modulan la respuesta inflamatoria. Adicionalmente y por su actividad ADPRT sobre las proteínas de las superfamilias RAS y Rho con funciones de migración y proliferación celular, previenen la regeneración de tejidos y la curación de heridas favoreciendo el establecimiento y proliferación de *P. aeruginosa*⁶⁶.

La exotoxina ExoU, también denominada PepA, es considerada la más potente citotoxina secretada por el SST3, siendo 100 veces más tóxica que ExoS y está asociada a infecciones severas en humanos. Los efectos citotóxicos observados tales como la destrucción de membranas y una rápida diseminación bacteriana, se explican por la actividad de fosfolipasa de ExoU, la cual requiere la activación o modificación de un factor eucarionte no identificado. También, degrada el principal lípido del surfactante pulmonar, dipalmitoil fosfatidil colina, contribuyendo a la diseminación bacteriana desde el pulmón hacia la sangre⁶⁷.

La cuarta proteína efectora secretada por SST3 de *P. aeruginosa* es Exo Y, una adenilato ciclasa, cuya presencia en el citosol de las células, aumenta la presencia de Adenosin Monofosfato Cíclico (cAMP). Sin embargo, la actividad de adenilato ciclasa requiere un factor eucarionte hasta ahora no descrito, pero es independiente de calmodulina⁶⁸. El aumento de este nucleótido, tiene efectos en la morfología celular por alteración en el citoesqueleto, la formación de aberturas intercelulares y el incremento en la permeabilidad pulmonar, efectos que favorecen la diseminación de la bacteria⁶⁹.

Otros factores de virulencia extracelulares

Además de la fosfolipasa C, *P. aeruginosa* produce otra hemolisina la cual es un glicolípido con características biosurfactantes y que contiene una o dos moléculas de ramnosa, llamadas **ramnolípidos (RLs)**⁷⁰. Estas dos hemolisinas, actúan de forma sinérgica para degradar los fosfolípidos del surfactante pulmonar, pérdida que resulta en la atelectasia característica de las infecciones agudas y crónicas por *P. aeruginosa*. Por lo anterior, la concentración de RLs en el esputo de los pacientes se relaciona con la gravedad de su estado^{71,72}. En cuanto a los efectos sobre el sistema inmune, inducen la actividad quimiotáctica de neutrófilos e inhiben la actividad fagocítica de los macrófagos. También, inducen la liberación de histamina por los mastocitos y de mediadores de la inflamación por las plaquetas, así como la lisis de los leucocitos polimorfonucleares, especialmente a altas dosis de RLs. En su conjunto, estos efectos contribuyen al daño pulmonar relacionado con la inflamación en los pacientes con FQ⁷³. La función ciliar y el daño en el epitelio pulmonar, están relacionados con la alteración en el transporte iónico debido a que se reduce la absorción de sodio y se aumenta el flujo de cloro hacia el epitelio bronquial. Así mismo, la producción de RLs es vital para la invasión del epitelio respiratorio y el establecimiento de la infección ya que en comparación con la cepa

silvestre, mutantes en el gen *rhlA*, un gen importante en la biosíntesis de este biosurfactante, son fácilmente eliminadas en modelos animales de infección externa como pulmonar⁷⁴.

La **piocianina** (PCN) o N-metil-1-hidroxi-fenazina, es un metabolito secundario con actividad oxido-reductora y responsable de la coloración azul-verdoso, característico de los aislamientos de *P. aeruginosa*⁷⁵. Debido a su capacidad de atravesar las membranas biológicas y de generar especies reactivas de oxígeno, son múltiples los efectos adversos en células y tejidos de sus hospederos eucariontes. Entre los principales están la inhibición de la respiración celular, la función ciliar, el crecimiento de las células del epitelio y pérdida de la homeostasis del calcio. Altera la respuesta inmune por diferentes mecanismos: induce la apoptosis de neutrófilos, disminuye la producción de quimiocinas y prostaciclina e incrementa la liberación de la IL-8, un importante quimioatrayente de neutrófilos, con un posterior daño tisular⁷⁶. Oxida el glutatión disminuyendo su concentración intracelular e inactiva la catalasa, mecanismo de protección del efecto tóxico del peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en células del epitelio respiratorio⁷⁷.

Dentro del arsenal de factores de virulencia, *P. aeruginosa* produce compuestos con la capacidad de competir por el hierro, elemento importante para el crecimiento y desarrollo de las bacterias⁷⁸. Sin embargo, el hierro no está disponible en el hospedero y está primordialmente en los grupos hemo de las hemoproteínas (hemoglobina, citocromos) o unido a proteínas como transferrina, lactoferrina y ferritina⁷⁸. Los **sideróforos** secretados por *P. aeruginosa* son la **pioverdina**, un pigmento verde-amarillento y fluorescente que se produce en condiciones de privación de hierro y la **piochelina**, las cuales mediante la formación de ferri-sideróforos, son introducidas de nuevo a la bacteria a través de receptores específicos en la membrana tales como Fpva y dependientes de la proteína TonB^{79,80}. Además de los sideróforos secretados, *P. aeruginosa* tiene otros mecanismos para la obtención del hierro tales como el uso de xenosideróforos, la captación de los grupos hemo del huésped y la reducción de Fe⁺² mediante las fenazinas^{81,82}. Además de ser un sideróforo, la pioverdina regula la producción de otros factores tales como la ETA, la endoproteasa PrpL y la pioverdina misma⁸³; en cuanto a su papel en la virulencia, se ha demostrado que mutantes en los genes de biosíntesis o los receptores tales como *tonB*, no son virulentas en modelos animales de infección y son importantes en el establecimiento de las biopelículas⁸⁴.

Otro metabolito secundario producido por *P. aeruginosa* es el **cianuro** (HCN), un potente tóxico responsable de la muerte de organismos eucariontes como *Caenorhabditis elegans* así como la posible destrucción de tejidos en pacientes con heridas infectadas por esta bacteria⁸⁵. La síntesis de este compuesto, se lleva a cabo a través de la descarboxilación oxidativa de la glicina por la HCN sintasa codificada por el operón *hcnABC*; una vez sintetizado, el HCN difunde rápidamente y actúa como un inhibidor de la cascada respiratoria en la mitocondria, actuando contra las citocromo C oxidasas y otras enzimas, resultando en una depleción de energía en la cadena transportadora de electrones⁸⁶. En individuos con FQ y bronquiectasia, es posible encontrar HCN; sin embargo, no se puede considerar un indicador decisivo de la presencia de *P. aeruginosa*, ya que células como los neutrófilos y aún otras bacterias pueden ser cianogénicas⁸⁷.

1.4 La comunicación célula-célula y el quórum sensing

Desde el descubrimiento de la vida procarionte, se pensaba que estos organismos tenían una existencia unicelular y que su único propósito, era encontrar nutrientes y dividirse; así mismo, que su respuesta a estímulos externos, era también de carácter unicelular. Diversos estudios genéticos en 1960s y 70s, mostraron evidencias de un comportamiento socialmente organizado en diversos organismos como por ejemplo: la formación del cuerpo fructífero en *Myxococcus xantus*, la producción del antibiótico estreptomycin y la formación de micelio aéreo en *Streptomyces griseus*, la inducción de la competencia genética de *Streptococcus pneumoniae* y el control de la bioluminiscencia de la bacteria marina *Vibrio fischeri* (*V. fischeri*), entre otros⁸⁸⁻⁹⁰. La coordinación de actividades se creía restringida a los organismos pluricelulares, se da en las bacterias gracias a la comunicación celular entre células y habilita a una población bacteriana, para diferenciarse de otros y comportarse colectivamente como grupo. También, el alcance de dicha organización es vasto y ofrece ventajas, entre otras, en procesos como la simbiosis, la adaptación a un ambiente, la producción de metabolitos secundarios, el combate de los mecanismos de defensa de organismos superiores, la migración hacia condiciones nutricionalmente más favorables y la adopción de nuevos modos de crecimiento tales como la esporulación y la formación de biopelículas⁹¹⁻⁹⁴.

El lenguaje utilizado en esta comunicación intercelular, consiste en pequeñas moléculas libremente difusibles llamadas autoinductores (AIs) y son el medio por el cual, una población

bacteriana regula su comportamiento acorde con la densidad poblacional. En 1994, Fuqua y colaboradores⁹⁵, introdujeron el término Quórum Sensing (QS) para describir el fenómeno de la comunicación célula-célula y cuyo principio, se basa en que cuando una célula crece y libera AIs al medio, su concentración es muy baja para ser detectada. A medida que el cultivo es más denso y suficientes bacterias están presentes, los AIs liberados al espacio extracelular, alcanzan una concentración umbral que le permiten a la bacteria, detectar una masa crítica de células y en respuesta, activar o reprimir un grupo de genes.

El sistema QS está presente en diversos organismos tanto procariontes como en eucariontes y particularmente en las bacterias Gram negativas, ha sido estudiado en un gran número de especies pertenecientes a las subclases de α y γ -proteobacterias, incluyendo bacterias de los géneros *Aeromonas*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Rhodobacter*, entre otras⁹⁶.

1.5 El sistema sensor de quórum en *Pseudomonas aeruginosa*

El fenómeno de autoinducción fue originalmente descubierto en *V. fischeri*, una bacteria marina y simbiote de diversos peces y calamares. En ellos, coloniza órganos especializados de luz o cavidades, donde encuentra un ambiente rico en nutrientes y alcanza densidades de $10^{10} - 10^{11}$ células/ml. En estas condiciones, produce la luciferasa, un compuesto con características luminiscentes, que permite a sus hospederos evadir depredadores o favorecer el apareamiento; pero en su forma de vida libre, las densidades de *V. fischeri* son menores: 10^2 células/ml y no es luminiscente^{90, 97, 98}.

El sistema de QS en *V. fischeri* y denominado *lux*, es el prototipo del mecanismo de comunicación celular en las bacterias Gram negativas que utilizan como AI homoserinas lactonas aciladas (HSL)⁹⁹. Este sistema, tiene dos componentes principales, dispuestos en unidades transcripcionales divergentes y separadas por una región intergénica regulatoria de 218 pares de bases (pb): el gen *luxR* que codifica el activador transcripcional LuxR y el gen *luxI* que codifica para LuxI, la sintasa de la HSL, N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserín lactona (OHHL)^{100,101}. El regulador LuxR, un polipéptido modular de 250 aminoácidos que requiere las chaperonas GroEL y GroES para su estabilidad y plegamiento en forma activa, tiene dos

dominios: el N-terminal, responsable de la unión a OHHL y el C-terminal, requerido para la unión al ADN a través de un motivo HTH (helix-turn-helix)^{95,102}.

Cuando la densidad celular de *V. fischeri* es baja, el gen *luxI* se expresa a niveles basales y la activación de LuxR es mínima, debido a las bajas concentraciones de OHHL en el medio. A medida que la población aumenta, de igual forma se incrementan las concentraciones de la señal dentro y fuera de la célula, debido a que la membrana es permeable a la OHHL; así, cantidades del orden de 10nM son suficientes para alcanzar niveles críticos o de “quórum” y activar la transcripción de los genes del regulón *lux*¹⁰³(Figura 2).

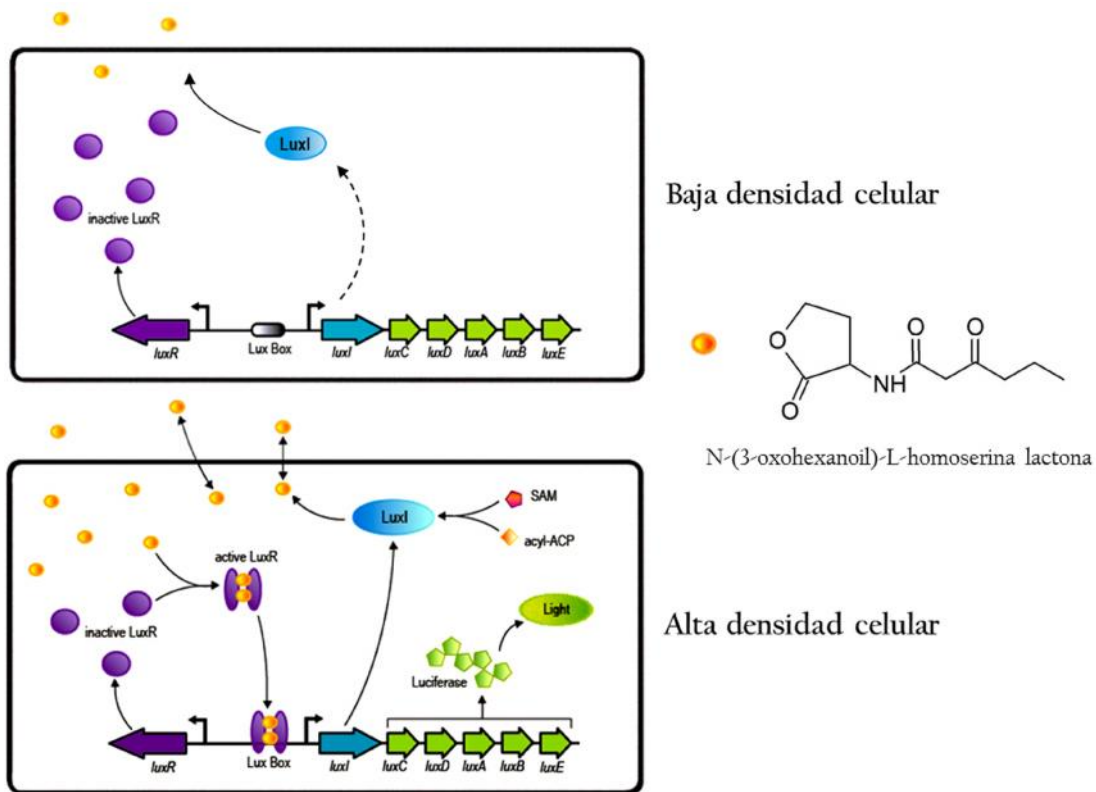


Figura 2. Regulación de la bioluminiscencia en *V. fischeri*, prototipo de la respuesta QS. A bajas densidades celulares hay una expresión basal de *luxI* y los niveles de OHHL son bajos dentro y fuera de la célula. Cuando la densidad celular aumenta, se acumulan niveles críticos de la señal; la OHHL se une a LuxR, el cual dimerizado, promueve la transcripción misma de *luxI* y los genes de la luciferasa. Adaptado de: http://2014.igem.org/Team:ETH_Zurich/project/background

En esta condición, LuxR es activado mediante la unión de la OHHL; dicha activación implica además, la dimerización y la exposición del dominio HTH^{102,104}. El complejo LuxR-OHHL activado, se une a elementos de ADN en las secuencias promotoras o cajas *lux*, palíndromes de 20 pb situados a -44 del sitio de inicio de la transcripción del operón *luxICDABE*^{104,105}. De esta

forma, se crea un circuito de autoinducción que regula positivamente la transcripción tanto de *luxI* como de los genes estructurales *luxCDABE*, éstos últimos responsables de la biosíntesis de las subunidades α y β de la luciferasa y un complejo de enzimas que produce el sustrato de la luciferasa misma, *luxAB* y *luxCDE*, respectivamente¹⁰⁶ (Figura 2). Por otro lado, los niveles de la OHHL en *V. fischeri* no están en continuo aumento y su producción está controlada mediante la acción represora del complejo LuxR-OHHL sobre *luxR*. El mecanismo de autorrepresión es desconocido, pero es dependiente de la presencia de una caja tipo *lux* ubicado dentro del gen *luxD*¹⁰⁷.

En *P. aeruginosa* están descritos tres sistemas de QS involucrados en la regulación de la producción de factores de virulencia, formación de biopelículas y motilidad^{99,108,109}. Dos de ellos, *las* y *rhl*, son homólogos del sistema LuxR/LuxI; el tercer sistema utiliza la 2-alkuil-4-quinolona (AQ) como señal y es denominado PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal)¹¹⁰⁻¹¹².

El sistema de QS *las* fue el primero en ser descrito en *P. aeruginosa* y regula la producción de la elastasa LasB, de allí su nombre. Comprende el activador transcripcional LasR y la sintasa LasI responsable de la síntesis del AI N-(3-oxododecanoil)-L-homoserín-lactona (3-o-C12-HSL). El sistema *rhl*, cuya denominación corresponde a la regulación en la producción de los ramnolípidos, posee el activador transcripcional RhlR y la sintasa RhlI que sintetiza el AI N-butiril-L-homoserín-lactona (C4-HSL). Cuando la concentración de los AIs alcanzan concentraciones umbrales dentro de la célula, estos forman un complejo funcional con su respectivo regulador transcripcional, así LasR/3-o-C12-HSL y RhlR/C4-HSL⁹⁹. Los reguladores transcripcionales activados se unen específicamente a secuencias del promotor de los genes regulados por cada sistema de QSR, referidas como cajas *las*¹¹³. En cuanto a la forma de unión, LasR forma multímeros y se une a las cajas *las* solo en presencia de 3-o-C12-HSL, mientras que RhlR forma dímeros y se une al ADN tanto en presencia como en ausencia de C4-HSL^{114,115}.

Se estima que muchos de los genes activados o reprimidos, son regulados indirectamente por el sistema QS, debido a que no poseen cajas *las* en sus regiones promotoras^{108,109}. Algunos de los genes de QS están regulados por ambos sistemas, mientras que otros son regulados específicamente por uno u otro sistema¹¹⁶. Los sistemas *las* y *rhl* a su vez, están autorregulados y conectados formando una cascada de regulación encabezada por LasR^{111,117}, cuya expresión

inicia en la fase exponencial y se incrementa en la fase estacionaria; sin embargo, diversos reportes muestran que dicha jerarquía es flexible y está nutricionalmente condicionada, principalmente por la disponibilidad de hierro y fosfatos^{114,118-121}.

El complejo LasR/3-o-C12-HSL regula positivamente la expresión de *lasI*, creando así un circuito de inducción positiva del AI¹²² y regula además, la expresión de *rhlR* y de *rhlI*. Se ha evidenciado y aunque en menor grado, un efecto del sistema *rhl* en la regulación de *rhlI*^{110,123}. El complejo LasR/3-o-C12-HSL regula también la producción de factores de virulencia tales como elastasa LasB^{124,125}, la proteasa LasA¹²⁶, la exotoxina A¹²⁷ y la metaloproteasa alcalina APRA^{125,127}. RhlR, el regulador transcripcional del segundo sistema QS, unido a su AI C4-HSL, activa la transcripción de genes cuyos productos son todos factores de virulencia: *rhlAB* y *rhlC*, los cuales codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de mono y di-ramnolípidos, respectivamente¹²⁸⁻¹³⁰, *lecA* que codifica para la lectina A (PA-IL)¹³¹, el operón, *phzA1-G1* involucrado en la biosíntesis de piocianina^{124,125} y el operón *hcnABC* que producen cianuro de hidrógeno HCN¹³²(Figura 3).

En cuanto al sistema PQS, este se reportó inicialmente en experimentos donde la adición de extractos producidos por la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 a cultivos de cepas mutantes en *lasR*, indujeron la expresión de *lasB* solo en presencia de un sistema *rhl* funcional¹¹². Estructuralmente PQS es la 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona y es el producto de los operones *pqsABCD*, *phnAB* y el gen *pqsH*, este último responsable de la conversión del precursor 2-heptil-4-quinolona (HHQ) en PQS^{133,134}. El operón *pqsABCDE* es regulado por PqsR, un factor transcripcional de la familia LysR, también denominado MvFR (Master virulence factor Regulador), el cual reconoce y se activa en presencia tanto de PQS como de HHQ, generando un circuito de regulación positiva¹³⁵. La relación de este sistema con los sistemas *las* y *rhl* es antagónica y se evidencia por la dependencia de la transcripción positiva de *pqsR* y *pqsH* por parte de LasR/LasI y la represión de *pqsABCDE* y *pqsR* por RhlR/RhlI, ambos efectos dependientes de la relación de AIs¹³⁶. Otros dos genes descritos y que podrían intervenir en la síntesis de PQS, son *pqsL* y *pqsE*. Mutantes en *pqsL*, sobre expresan PQS y acumulan HHQ ocasionando autólisis y muerte de la bacteria¹³⁷. El gen *pqsE* aunque es parte del operón, codifica para una metalo- β -lactamasa y la delección del mismo, no afecta la producción de PQS ni HHQ; sin embargo, sus mutantes no producen piocianina ni PA-IL, lo cual sugiere un papel

en la capacidad de responder a PQS efectivamente por parte de la bacteria y a través de una señal desconocida¹³⁸. La importancia de PQS en la producción de factores de virulencia e infección de *P. aeruginosa*, es aún debatible; no obstante, mutantes en este sistema muestran una significativa reducción en la producción de piocianina, elastasa, lectina A (PA-IL), ramnolípidos y formación de biopelículas^{133,139}. Así mismo, es requerido para su virulencia en plantas y nemátodos y tanto PQS como sus precursores y derivados, se encuentran en los fluidos de los enfermos de FQ^{134,140}.

Una cuarta señal de comunicación intercelular, la cual integra el estrés de factores ambientales con el sistema QS se describió recientemente. Esta señal, la cual se denominó IQS, pertenece a una nueva clase de moléculas cuya estructura corresponde a la 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído¹²⁰. Los genes de biosíntesis están organizados en el operón *ambABCDE*, cuya descripción inicial se relacionó con la síntesis y exportación de un anti-metabolito (AMB) con actividad inhibitoria sobre *Escherichia coli* (*E. coli*) K12, el ácido L-2-amino-4-metoxi-trans-3-butenoico¹²⁰. El gen *ambA* codifica para una proteína translocadora de soluto transmembranal y perteneciente a la superfamilia de LysE, mientras que los genes *ambB* y *ambE* codifican para una sintetasa modular de péptidos no ribosomales, y *ambC* y *ambD* codifican para dos posibles dioxigenasas de la familia TauD¹²⁰. La mayoría de las cepas secuenciadas de *P. aeruginosa* producen IQS, excepto las cepas PA7 y 138244, debido a que carecen del operón de biosíntesis. El papel regulatorio de IQS en el sistema de QS, consiste en la activación del sistema *rhl* de manera independiente del sistema *las* y de PqsR en condiciones limitantes de fosfato. Mutantes en *ambB* no afectan la producción de 3-o-C12-HSL y muestran una significativa reducción de C4-HSL y PQS, al igual que la producción de factores de virulencia como piocianina, elastasa y ramnolípidos. Sin embargo, esta señal es más potente respecto de las HSL y concentraciones de 10nM, son suficientes para restaurar el fenotipo en una mutante no productora de IQS. Contrario a lo inicialmente reportado, el operón *ambABCDE*, no codifica para el AMB sino que produce a IQS que es a su vez, la señal requerida para la producción del AMB a través de los sistemas *rhl* y PQS. Así mismo, la producción de IQS está regulada positivamente por el sistema *las* y por el sistema de dos componentes PhoB/R en condiciones de alto fosfato. Finalmente la presencia del factor IQS, podría explicar la producción de factores de virulencia en aislamientos pulmonares mutantes de *lasR*¹⁴¹ y la producción de factores de virulencia que responde a retos ambientales como la limitación de fosfato^{119, 121,142}.

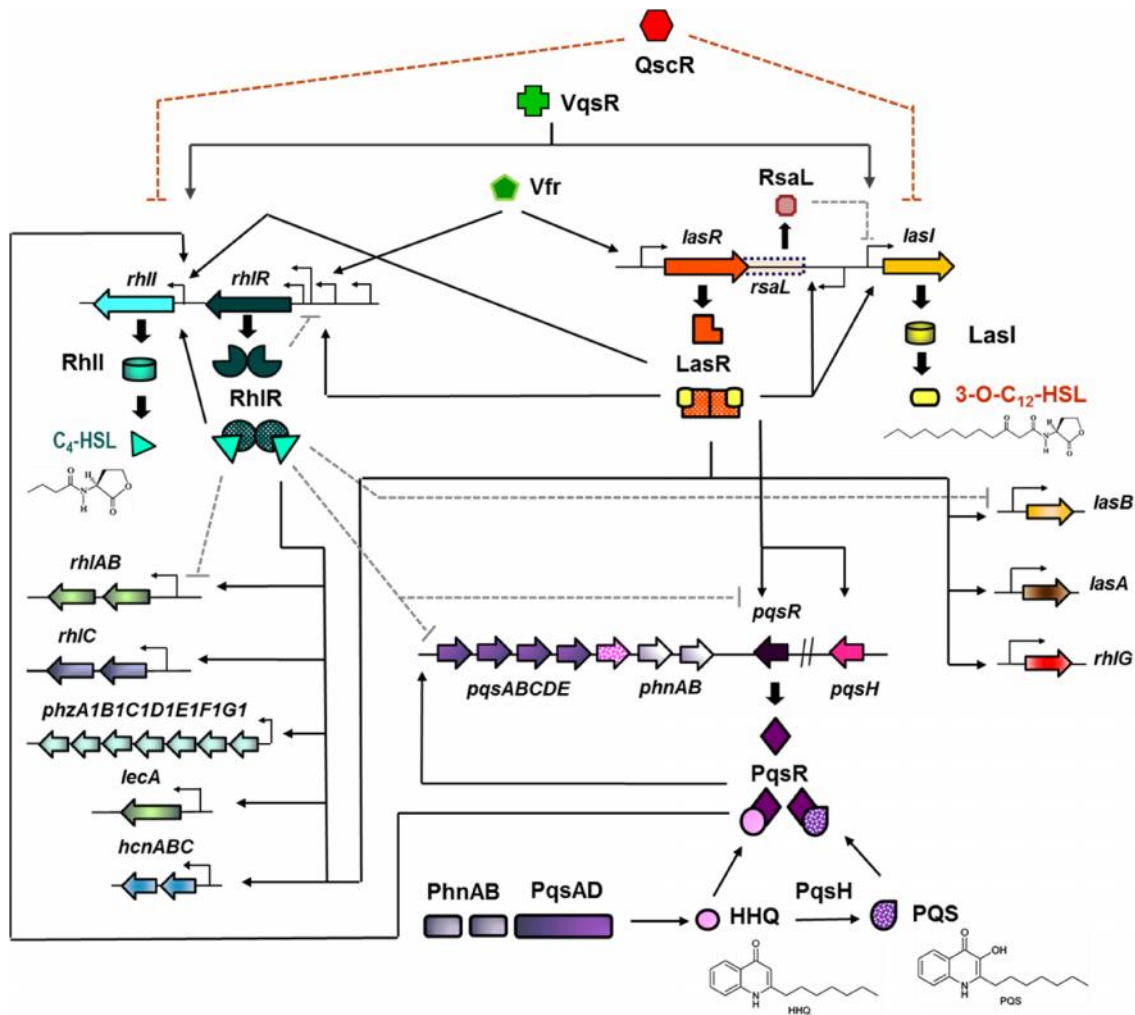


Figura 3. Esquema de la regulación de la respuesta QS en *P. aeruginosa*. El sistema Las encabeza la cascada jerárquica, regulando el sistema Rhl y la producción de PQS. Los reguladores transcripcionales LasR, RhlR y PqsR unidos a su AI, regulan la expresión de factores de virulencia y las sintetas de sus propias señales, 3-o-C₁₂-HSL, C₄-HSL y PQS, respectivamente. Algunos reguladores globales (Vfr, VqsR y QscR) que controlan el sistema QS mediante la activación o represión de sus componentes, están incluidos.

La expresión de factores de virulencia a través del sistema QS en *P. aeruginosa*, es dependiente de la fase de crecimiento, así la producción plena de los mismos, se da en la fase denominada “quórum” y coincide con el inicio de la fase estacionaria donde se alcanzan concentraciones críticas de AIs; sin embargo, la adición temprana de AIs en cultivos en fase logarítmica o “pre-quórum”, no resulta en la activación inmediata de los genes regulados por QS^{108,116,143,144}. No obstante, la expresión de LasR y RhlR bajo un promotor inducible por arabinosa y en presencia de sus respectivos AIs, inducen en la fase logarítmica la expresión de algunos genes de virulencia controlados por el sistema QS¹⁴⁵. Estas observaciones, sugieren la existencia de

factores adicionales que controlan el encendido de QS, mediante la expresión o función de los reguladores transcripcionales LasR y RhlR en las diferentes etapas de crecimiento y/o actúan como co-reguladores de algunos genes controlados por QS; muchos de estos factores son reguladores globales que mantienen la homeostasis del sistema QS y responden a factores ambientales, estados metabólicos de la célula o responden a otras moléculas señal¹⁴⁶.

A este respecto, el sistema *las* es regulado negativamente por la proteína RsaL, la cual se une a la región promotora de *lasI* reprimiendo su expresión. Los genes *lasI* y *rsaL* son transcritos de forma divergente y ambos son regulados por LasR/3-o-C12-HSL; RsaL y LasR no compiten por el mismo sitio de unión, pero ocupan regiones adyacentes y cuando ambos reguladores se unen al promotor, la actividad represora de RsaL es dominante sobre la activación de LasR¹⁴⁷. Así, la dependencia de LasR/3-o-C12-HSL tanto de *rsaL* como de *lasI*, generan un circuito de regulación negativo y positivo, respectivamente, del sistema *las*. Es importante mencionar que RsaL como regulador global, controla otros 130 genes y reprime de forma independiente a su efecto sobre *lasI*, otros genes que son activados por los sistemas *las* y *rhl* de QS. Mutantes en *rsaL* generan un fenotipo hipervirulento en el modelo de infección *Galleria mellonella*; muestran un incremento en la motilidad, la sensibilidad a los antibióticos y la producción de factores de virulencia tales como elastasa y cianuro, entre otros y una reducción en la formación de biopelículas¹⁴⁸.

Uno de los reguladores más importantes es Vfr (Virulence factor regulador), un homólogo de la proteína receptora de AMP cíclico de *E. coli* (CRP) que regula positivamente la transcripción de *lasR*, dando inicio así al encendido del sistema QS y a la cascada de regulación^{149,150}. A diferencia de su homólogo CRP, la regulación de *lasR* por Vfr es independiente de AMP cíclico¹⁵¹, mientras que la expresión de factores de virulencia importantes tales como SST2 y SST3, ToxA, FleQ (el regulador principal de la biogénesis del flagelo) y los reguladores RhlR, PtxR (regulador de ToxA) y Vfr mismo, requieren la presencia de AMP cíclico^{149,152-154}.

El factor sigma de la fase estacionaria RpoS (σ^S), tiene efecto sobre algunos genes regulados también por el sistema QS de *P. aeruginosa* y que son expresados en esta etapa de crecimiento^{155,156}. Aunque hay una inducción marginal de RpoS sobre *lasR* y *rhlR* en la fase estacionaria, se sugiere que el mecanismo de regulación sobre los genes dependientes de QS es

indirecto por la activación de estos dos reguladores. RpoS regula positivamente *lecA*, *algR* y *toxA*, entre otros y reprime la expresión de los operones *hcnABC* y *phzAI*^{156,131}.

Otros mecanismos descritos para mantener la homeostasis de QS a través del control de los niveles de 3-o-C12-HSL, son las HSL acilasas de cadena larga que en *P. aeruginosa* son PvdQ y QuiP^{157,158}.

Aparte de LasR y RhIR, *P. aeruginosa* posee otros dos homólogos de LuxR que funcionan como reguladores globales de QS, QscR (Quórum-sensing-control Repressor) y VqsR (Virulence and quorum-sensing Regulador)¹⁵⁹. QscR, reprime la expresión de factores de virulencia tales como piocianina, cianuro de hidrógeno y la elastasa LasB, a través de la represión de *lasI*, controlando de esta forma la cascada regulatoria de QS. El mecanismo de represión de este regulador depende de la interacción de QscR con LasR y RhIR, formando heterodímeros a bajas concentraciones de sus respectivos AIs. Así mismo y aun cuando la región promotora de *qscR* tiene cajas *las*, las mutantes en *lasR* no están afectadas en la producción de QscR¹⁶⁰. VqsR tiene un efecto opuesto a QscR ya que mutantes en *vqsR* no producen HSL y presentan una disminución en la producción de piocianina y elastasa, al igual que una atenuación de la virulencia contra *C. elegans*. La presencia de una caja *las* en la región promotora de *vqsR* reconocida por LasR en presencia de 3-o-C12-HSL, indica que este regulador está bajo el control de sistema *las* de QS en un circuito de regulación positiva^{161,162}.

Como anteriormente se refirió, la concentración de los AIs es importante para encender la respuesta QS y dar inicio a la expresión de genes dependientes de este sistema. Fuera de la célula y en ambientes complejos, la acumulación umbral de HSL depende de factores como el pH, la temperatura¹⁶³ y la presencia de enzimas degradadoras, entre otros¹⁶⁴. Dentro de la célula, existen factores que regulan dicho umbral e impiden la expresión prematura de factores de virulencia, hecho que afectaría el establecimiento de *P. aeruginosa* en sus hospederos. Además de QscR, el reporte de dos reguladores QteE y QsIA, los cuales controlan el umbral de inicio de QS, añaden elementos a la ya compleja red de regulación de QS^{144,165}.

QteE (quorum threshold expression element), es una proteína de 190 aminoácidos, considerada como un regulador único de *P. aeruginosa* y sin homólogos en otras especies¹⁴⁴. Previo a su descripción funcional, se reportó la posible activación por LasR¹⁶⁶ y se propuso,

funciona como anti-activador de QS de forma análoga a cómo funciona TraM en *Agrobacterium tumefaciens*¹⁶⁷. La represión de QteE sobre los genes regulados por QS es postraduccional y se da mediante la reducción independiente de la estabilidad de LasR y RhlR, reducción producida probablemente por la interacción proteína-proteína. Aunque los efectos de la expresión *qteE* son superados con la sobre-expresión de *lasR*, esto evidencia la importancia de una relación estequiométrica entre LasR y QteE, para el control de este último. Así, en la fase “pre-quórum”, la actividad de QteE supera a LasR, pero a medida que avanza la curva de crecimiento, la de LasR predomina¹⁴⁴. La sobre-expresión de QteE, reprime la producción de piocianina y 3-o-C12-HSL, mientras que su mutación resulta en la producción temprana de los 3-o-C12-HSL, elastasa LasB y proteasas, factores que se acumulan a lo largo de la curva de crecimiento y son superiores respecto del fenotipo silvestre^{168,169}. Sin embargo, el efecto en la virulencia de este factor, evaluada en modelos animales de infección, es marginal tanto en la letalidad como en el establecimiento de infecciones crónicas de *P. aeruginosa*¹⁶⁸.

QsIA, es una proteína de 104 aminoácidos y tiene homólogos en otras especies de *Pseudomonas*, incluyendo *P. aeruginosa*, *P. mendocina*, y *P. fluorescens*, aunque en ninguna de ellas se había caracterizado previamente. Este regulador, descubierto en una búsqueda de proteínas que pudieran interactuar con LasR, tiene un papel represor sobre los tres sistemas de señalización de QS y la producción de factores de virulencia, excepto para el gen *lasI*, cuya expresión se reduce, así como los niveles de 3-o-C12-HSL; reducción que se explica por la inducción de la expresión de *rsaL* en una mutante de *qsIA* y por el aumento en la transcripción de *lasI* en una doble mutante *qsIA/rsaL*¹⁶⁵. El mecanismo regulatorio es postranscripcional, debido a que QsIA no tiene un dominio HTH e inhibe la actividad de LasR sobre *lasI*. Por análisis de su estructura secundaria, se encontró que comparte una α -hélice conservada en los anti-activadores TraM y TraM2 de *A. tumefaciens*, hecho que supone su mecanismo de acción sobre LasR, mediante la interacción proteína-proteína. QsIA existe como dímero e interactúa con el dominio de unión de 3-o-C12-HSL, además de ocupar la interfase de dimerización de LasR, afectando de esta forma la unión de LasR con el ADN de los promotores blanco, efecto que es dosis dependiente de QsIA e independiente de las concentraciones de 3-o-C12-HSL. Particularmente, y con base en que LasR existe como dímero, se postula que tres pares de estos dímeros interactúan con un hexámero de QsIA^{165,170}.

Otros reguladores no menos importantes a los anteriormente descritos, incluyen a los sistemas de dos componentes GacA-GacS^{171,172} y PhoBR^{121,173}, el factor sigma alternativo RpoN^{174,175}, la proteína de respuesta a estrés RelA¹⁷⁶, las proteínas MvaT/U, miembros de la familia H-NS (histone-like nucleoid structuring) involucradas en el silenciamiento de genes^{177,178} y los reguladores pos-transcripcionales RmsA y DksA^{179,180}.

1.6 Factores ambientales y la expresión de factores de virulencia

La adaptación rápida y eficiente a una gran variedad de ambientes es una característica esencial de las bacterias para asegurar su supervivencia. Dicha adaptabilidad, está en función de los sistemas que detectan las señales externas y en la elaboración de una respuesta oportuna, traducida en el cambio o re-ajuste de su constitución bioquímica y de su fisiología¹⁸¹.

Para las bacterias patógenas, en cuyo ciclo vital se alternan estadios de vida libre y asociados a procesos infecciosos en organismos susceptibles, la habilidad adaptativa cobra especial importancia; por tanto se requieren mecanismos que detecten, integren y traduzcan las señales externas, permitiendo la regulación de un grupo de genes, cuyos productos le asistan en la invasión, evasión de los sistemas de defensa y diseminación exitosa en su hospedero¹⁸². Así como en su hábitat natural, en los reservorios ambientales o huéspedes, la expresión de genes en la mayoría de las bacterias, es un fenómeno altamente regulado y afectado por una variedad de parámetros tales como la temperatura, la osmolaridad, el pH, la disponibilidad de oxígeno, la concentración de iones, la fase de crecimiento y la densidad poblacional, entre otros¹⁸²⁻¹⁸⁴.

Entre los diversos retos ambientales, la temperatura es un factor de vital importancia que condiciona la viabilidad y el crecimiento, debido a que afecta todos los procesos celulares. Es además, el principal factor que determina la expresión o represión de factores de virulencia en las bacterias patógenas^{210,219-223}. Para responder a las variaciones de la temperatura, se requiere de mecanismos termosensores para traducir este evento en una respuesta genética práctica, regulada y energéticamente viable. La necesidad de regulación se explica bien sea por los altos costos derivados de la expresión innecesaria de genes asociados a la virulencia, y cuya producción no es requerida en una condición; y por el control en la expresión diferenciada de los factores de virulencia que intervienen en las etapas de la infección, estos

últimos en virtud del cambio en los microambientes del huésped y como consecuencia de la patogénesis^{185,186}.

1.6.1 Termosensores en bacterias

El cómo las bacterias perciben y responden a la temperatura parece estar determinado por la capacidad de definir y localizar estos cambios en sus biomoléculas constituyentes, las cuales pueden ser en sí mismos termosensores directos o indirectos mediante un cambio en su conformación estructural. Así, las consecuencias de un cambio en la temperatura más que la temperatura misma, proporcionan una señal que la célula reconoce y a la cual responde; por tanto, al menos tres eventos se pueden distinguir y que intervienen en los mecanismos de la termorregulación: la estructura del ARN mensajero (ARNm), el plegamiento de las proteínas y la topología del ADN, esta última, determinada por la curvatura y el superenrollamiento¹⁸⁴⁻¹⁸⁶.

El ADN como termosensor

La molécula de ADN no solo es un depósito lineal de la información genética, sino que su estructura es determinante en el acceso a la misma y alteraciones en su integridad y topología, tendrán consecuencias en la expresión genética¹⁸⁷. Uno de los parámetros afectados por la temperatura es el **superenrollamiento del ADN**, parámetro controlado por la acción de la girasa y las topoisomerasas. Particularmente, se ha observado que los plásmidos de bacterias mesófilas e hipertermófilas pueden experimentar un cambio reversible en sus niveles de superenrollamiento dependiendo de la temperatura¹⁸⁸. En las bacterias mesófilas como *E. coli*, *Salmonella* o *Bacillus subtilis*, el ADN tiene un superenrollamiento negativo y el choque de calor induce en sus plásmidos, un aumento transitorio del superenrollamiento positivo, permitiendo un relajamiento de los mismos; así mismo, en las hipertermófilas como las arqueas *Sulfolobus* y *Thermococcus*, el ADN tiene un superenrollamiento positivo, el cual se incrementa por el aumento en la temperatura. Debido a que la eficiencia de la transcripción se afecta por los cambios en el superenrollamiento de ADN, este mecanismo es utilizado por las bacterias para termorregular la expresión de los genes, incluyendo aquellos requeridos para la virulencia¹⁸⁹.

Otra característica asociada a la función del ADN como termosensor, es su **curvatura**. Las regiones intrínsecamente curvadas, son segmentos ricos en adeninas y timinas (AT), localizadas corriente arriba de los promotores. Las fluctuaciones de la temperatura, inducen cambios en la topología de estas regiones y modifican así la afinidad de la ARN polimerasa y la transcripción de los genes¹⁹⁰. En *Chlostridium perfringes* por ejemplo, la alteración en la curvatura en el promotor del gen de la fosfolipasa C (*plc*), induce su expresión a bajas temperaturas¹⁹¹ y en la cianobacteria *Synechocystis*, la expresión del gen *desB*, asociado al mantenimiento de la fluidez de las membranas, se induce a bajas temperaturas debido al aumento en el superenrollamiento del ADN en su región promotora¹⁹². Así, este mecanismo facilita una rápida adaptación a los cambios de temperatura en estas especies.

La curvatura del ADN también está involucrada en la represión indirecta de la transcripción, mediante la unión de proteínas silenciadoras como H-NS. La proteína H-NS pertenece a la superfamilia de proteínas asociadas al nucleóide y está presente en las bacterias Gram negativas; tiene un papel importante en la regulación de la respuesta a factores ambientales como la temperatura y la osmolaridad. También, afecta un gran número de genes con funciones de mantenimiento de la célula y factores de virulencia¹⁹³. Aunque su unión al ADN no depende del reconocimiento de una secuencia específica, H-NS prefiere regiones ricas en AT y estabiliza las curvaturas ya existentes en los promotores de los genes, formando grandes oligómeros en las regiones adyacentes. Tanto la unión al ADN como la capacidad de oligomerización, están reguladas por la temperatura y se reducen en respuesta a la temperatura del huésped¹⁹⁴. Varios ejemplos ampliamente caracterizados en patógenos humanos ilustran este mecanismo: la producción del pili Pap en *E. coli* uropatógena¹⁹⁵, la expresión del SST3 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium¹⁹⁶ y la expresión de VirF en *Shigella flexneri*¹⁹⁷, de la cual se hará un breve descripción.

S. flexneri es un patógeno capaz de invadir el epitelio intestinal en humanos y la síntesis del activador transcripcional VirF, la cual ocurre a temperaturas por encima de los 32°C, es el primer evento realizado una vez entra en el hospedero. Este regulador activa la transcripción de diferentes operones cuyos productos participan en la invasión. El promotor de *virF* posee una amplia región curvada de ADN, la cual sirve como termosensor, ubicada en medio de dos sitios de unión a H-NS¹⁹⁷. El efecto de la temperatura sobre el promotor de *virF* está antagónicamente mediado por las proteínas H-NS y FIS (Factor for inverse stimulation), las

cuales se unen en diferentes sitios. A bajas temperaturas, el promotor de *virF* tiene una conformación cerrada gracias a que los dos sitios de unión H-NS están lo suficientemente cercanos para favorecer la formación de un puente núcleo-proteico, el cual se abre una vez se incrementa la temperatura; esto permite el acceso de la ARN polimerasa. En condiciones cercanas a la temperatura umbral de activación (28-32°C), el sitio de unión de FIS es expuesto incrementando la transcripción de *virF*¹⁹⁸.

Las proteínas como termosensores

Las proteínas que funcionan como termómetros son diversas tanto en su estructura como en su función. Los cambios de temperatura pueden tener efectos tanto en la organización estructural (estructuras terciaria y cuaternaria), como en la formación o desintegración de complejos proteicos. En cuanto a la función, las proteínas sensoras pueden ser **reguladores transcripcionales, chaperonas, proteasas, quimiosensores y cinasas**^{184,186}.

Descripciones detalladas de cómo en algunas bacterias patógenas y no patógenas, las proteínas intervienen en los procesos de termorregulación incluyen a las proteínas TlpA de *S. typhimurium*¹⁹⁹, RovA²⁰⁰ y YmoA de *Yersinia pestis*²⁰¹, GmaR de *Listeria monocytogenes*²⁰², el sistema de dos componentes PhoP-PhoQ de *Edwardsiella tarda*²⁰³ y RheA de *Streptomyces albus*²⁰⁴, entre otros. Se hará una breve descripción de los primeros tres casos mencionados.

Muchos aislados de *S. typhimurium* son portadores de un plásmido asociado a la virulencia, el cual, aparte de otras funciones, codifica para la proteína TlpA¹⁹⁹. TlpA es un represor transcripcional autorregulado, cuya actividad represora y termosensora depende de su concentración y del equilibrio entre monómeros libres no funcionales y oligómeros. El mecanismo de acción reside en un dominio de α -hélice superenrollada (**coiled-coil**) que cubre dos tercios de la porción C-terminal de TlpA y es responsable de la oligomerización. A bajas temperaturas (28°C), TlpA se une a su propio promotor a través del dominio de unión a ADN en el N-terminal, unión que solo se da en su estado oligomérico y así reprime su expresión. A medida que la temperatura aumenta, la proporción de oligómeros disminuye dando lugar a la transcripción de *tlpA*, cuyos niveles máximos se alcanzan a 43°C¹⁹⁹.

Para muchos patógenos facultativos como *L. monocytogenes*, la motilidad flagelar es importante para sobrevivir tanto fuera como dentro del huésped. Durante los primeros estadios de la

infección, el flagelo favorece la adherencia y la invasión, sin embargo por su capacidad inmunogénica, es también un elemento detrimental para la sobrevivencia de la bacteria. Por lo anterior, la formación de esta estructura y la motilidad son dependientes de la temperatura del huésped²⁰⁵. La transcripción de los genes del flagelo está controlada por las actividades recíprocas del represor MogR y el antirrepresor **GmaR**, además del regulador de respuesta DegU. MogR reprime los genes del flagelo a 37°C, uniéndose a sus todos sus promotores y aunque se expresa de forma constitutiva a cualquier temperatura, por debajo de 37°C, GmaR contrarresta su actividad represora, formando un complejo con MogR. Así mismo, como *gmaR* es activado constitutivamente por DegU y reprimido por MogR, la actividad antirrepresora de GmaR induce la sobre-expresión de su propio gen. GmaR además de ser antirrepresor, funciona como termosensor a través de un cambio en su conformación dependiente de la temperatura, y que afecta su interacción con MogR. Así, a 37°C MogR es liberado y GmaR es degradado²⁰².

Y. pestis es un patógeno humano causante de la peste bubónica. Al pasar de sus reservorios ambientales o vectores (pulgas) a sus hospederos mamíferos, encuentra cambios significativos de temperatura y debe por tanto, ajustar la expresión de sus genes. La proteína RovA es una proteína de unión a ADN que coordina entre otros, la expresión de genes de virulencia que contribuyen a la colonización, tales como invasinas y adhesinas²⁰⁶. Por otro lado, a temperaturas moderadas (20-25°C), *rovA* se expresa a partir de dos promotores, mientras que a 37°C no se expresa; además, *rovA* se autorregula positivamente, uniéndose a su propio promotor de forma cooperativa. Adicionalmente, la transcripción de *rovA* es regulada por la fase de crecimiento y por la composición del medio de cultivo. El mecanismo por el cual RovA funciona como termómetro es a través de un cambio de conformación, el cual modula su capacidad de unión al ADN y la expone a la degradación de las proteasas Lon y ClpP²⁰⁰.

Adicionalmente, el SST3 de *Y. pestis*, importante para la patogenicidad en humanos, se encuentra codificado en el plásmido pCDI y es termorregulado por la proteína YmoA. Todos los genes asociados a este sistema de secreción no se expresan a bajas temperaturas pero los son plenamente a 37°C y en ausencia de calcio extracelular. Adicionalmente, están regulados por el activador transcripcional LcrF, el cual es una proteína parecida a las histonas²⁰¹. El mecanismo de termorregulación está fundamentado en la susceptibilidad de YmoA a la degradación proteolítica a 37°C, consecuencia de un cambio conformacional y por la acción de las proteasa Lon y/o ClpXP. De esta forma, los genes del SST3 son reprimidos a bajas

temperaturas e inducidos a 37°C. Aunque Lon se expresa y es activa a todas las temperaturas, en ausencia de la misma, ClpXP lleva a cabo la proteólisis. Aunque el mecanismo por el cual YmoA es degradada no está completamente establecido, se propone la existencia de una proteína accesoria que se induce a 37°C y modifica a YmoA o la hace blanco de la degradación²⁰¹.

1.6.2 Termómetros de ARN

El ARNm se había considerado solo como un portador pasivo de la información genética necesaria para la síntesis de proteínas; pero en las últimas dos décadas un creciente número de estudios demuestran que posee importantes funciones reguladoras de la expresión de genes²⁰⁷⁻²¹¹. Muchos ARNm tienen la habilidad de detectar y responder a señales químicas y físicas por sí mismos, así dichos sensores contienen incorporados elementos de control en la región 5' no traducible (5'-UTR), los cuales forman estructuras complejas; el cambio de conformación de tales estructuras ocurre en respuesta a retos ambientales específicos y afectan la transcripción, la traducción y la estabilidad del ARNm^{210,211}.

La regulación dependiente de los sensores de ARN es diversa y dos clases de elementos: *trans* y *cis*, son claramente distinguibles. Los elementos que actúan en *trans* son generalmente ARN pequeños no-codificantes (ncARN) y que por complementariedad de su secuencia, se unen al 5'-UTR de un ARNm blanco. Dicha unión da lugar a la formación de complejos que reprimen la producción de una proteína mediante la inhibición de la traducción, la degradación de ARNm o ambas. También, se ha descrito un efecto positivo mediante la prevención en la formación de estructuras secundarias que inhiben la traducción^{212,213}.

Respecto de los elementos que actúan en *cis*, los **riboswitches** y los **termómetros de ARN (ARNT)**, explotan el potencial del ARNm para formar estructuras secundarias y terciarias complejas. Alteraciones en las mismas inducidas por metabolitos químicamente diversos y por variaciones de temperatura, respectivamente, afectan la expresión del transcrito que está corriente abajo. Aun cuando estos dos sensores de ARN comparten ciertas similitudes, existen diferencias fundamentales tales como la señal a la que estos responden, los genes y procesos que regulan, la organización estructural, la conservación de su secuencia en procariontes y el tipo de respuesta^{211,214}.

Los ARNT controlan tres procesos importantes y dependientes de la temperatura: la respuesta al choque por calor HSR (heat shock response)²¹⁵⁻²¹⁶; la respuesta al choque por frío CSR (cold shock response)^{217,218} y la expresión de factores de virulencia en bacterias patógenas^{210,219-223}. La mayoría de los ARNT descritos hasta la fecha funcionan a través de un mecanismo simple y sin la participación de un factor adicional^{214,224}; a bajas temperaturas, la estructura presente en la 5'-UTR adopta una conformación que ocluye, total o parcialmente, el sitio de unión al ribosoma o secuencia Shine-Dalgarno (SD) e impide el acceso de la subunidad 30S. Un incremento en la temperatura hasta 37°C o mayor, induce una apertura gradual o tipo cremallera (**zipper**) de la estructura que libera el SD y permite la traducción^{210,224}. Este mecanismo tiene un efecto instantáneo sobre la expresión de un transcrito que porta un ARNT asociado y como resultado, proporciona una respuesta gradual, reversible y poco costosa para las bacterias. La funcionalidad de los ARNT en el rango de temperatura característico de las bacterias mesófilas, requiere que las estructuras sean lo suficientemente estables para resistir o impedir la apertura de la misma a temperaturas inferiores a 30°C, pero en tal grado inestables, para abrirse cuando la temperatura se incremente. La calibración de estos sensores permite detectar variaciones hasta de 1°C²²⁵. Dichas características se logran a través de un balance del apareamiento de bases Watson-Crick y apareamientos no canónicos, las estructuras de asa (**loops**) y las salientes (**bulges**) que se forman en su interior²²⁶, componentes presentes en todos los ARNT conocidos y que condicionan su estabilidad termodinámica (Figura 4).

Termómetros de ARN y la HSR

La mayoría de los ARNTs descritos hasta la fecha controlan la expresión de los genes que participan en HSR en bacterias^{216,219,227-229,241}. La HSR es una respuesta adaptativa y universal, en la cual y en respuesta a un aumento drástico de la temperatura, se induce la producción de proteínas de choque por calor HSPs (heat shock proteins), principalmente chaperonas moleculares y proteasas²³⁰.

En *E. coli*, la inducción de las HSPs se logra mayoritariamente por un incremento en los niveles del factor sigma alternativo σ^{32} , el regulador maestro de la HSR, el cual es codificado por el gen *rpoH*. Los niveles intracelulares de este factor están estrictamente controlados por eventos transcripcionales, postranscripcionales y postraduccionales, incluyendo la estabilidad y el control de la actividad de RpoH²³¹.

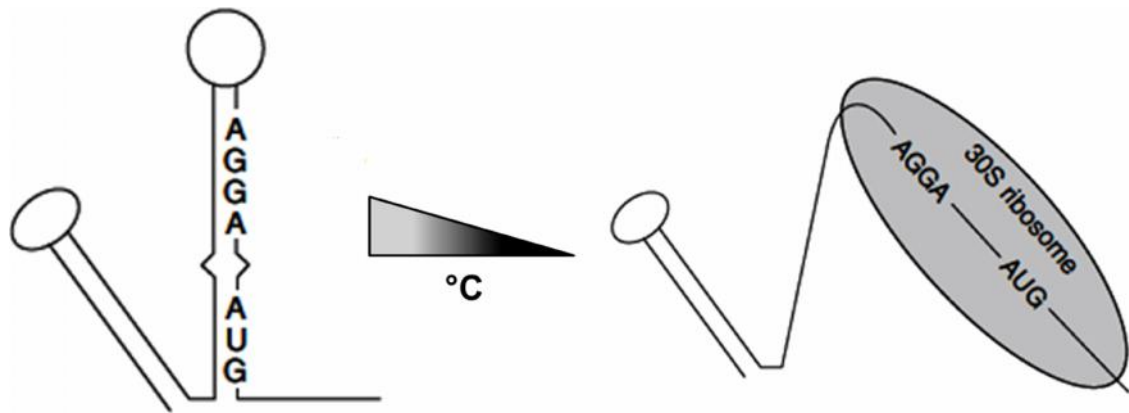


Figura 4. Mecanismo de acción de las estructuras que actúan como termómetros de ARN. A bajas temperaturas (izquierda), la secuencia SD y en algunas ocasiones el codón de inicio (AUG), se encuentran atrapados en una estructura tallo-asa que bloquea el acceso a los ribosomas. A 37°C o mayores (derecha), un rearrreglo en la conformación de la estructura, libera el SD y el AUG, permitiendo el inicio de la traducción²¹⁰.

El ARNT que regula la expresión del gen *rpoH*, es hasta ahora el más complejo en su estructura y su ubicación, ya que casi toda la región regulatoria del mismo está en la porción codificante y no en la 5'-UTR. A diferencia de la mayoría de los ARNT, a 30°C la SD no es secuestrada sino expuesta parcialmente en la 5'-UTR y el codón de inicio AUG es secuestrado y estabilizado en una estructura de tallo del segmento A. Los segmentos A y B, los cuales abarcan desde la base 1 hasta la 220 del marco abierto de lectura de *rpoH*, controlan la eficiencia de la traducción mediante la formación de una extensa estructura secundaria que bloquea el acceso al SD. A 42°C las estructuras inhibitorias son debilitadas, permitiendo el acceso a los ribosomas y el inicio de la traducción²²⁸.

Un grupo de ARNT, quizá el más abundante y moderadamente conservado, corresponde a los elementos ROSE (repression of heat shock expression). El prototipo de estos elementos fue descrito inicialmente en el gen *hspA* de *Bradyrhizobium japonicum*^{216,232} (Figura 5, Tabla 1) y posteriormente en la 5'-UTR de los genes que codifican para las proteínas pequeñas del choque por calor (sHsps) de las α y γ -proteobacterias, incluyendo los genes *ibpAB* de *E. coli*²³³. Tienen una longitud de entre 60 y 100 nucleótidos (nt) y se pliegan en una compleja estructura secundaria compuesta por entre 2 y 4 formas de tallo-asa individuales y donde la SD y en algunos casos, el AUG, están localizados en el último tallo-asa, próximo al 3'^{216,226}. El componente más importante y universalmente conservado en todos los elementos ROSE es un residuo de guanina (G) presente en la secuencia de la cadena opuesta a la SD²²⁶. Por estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), se demostró que este residuo forma un apareamiento G-G energéticamente inestable con la SD y su eliminación abate la capacidad

para responder a la temperatura^{216,234}; los demás nt alrededor de la G y de la SD, contribuyen mediante un balance de apareamientos y formación de estructuras de asa, con las características termosensoras de estos ARNT^{226,234}. La apertura gradual y liberación del SD, resultado del aumento de temperatura, ocurre mediante el mecanismo tipo cremallera, también característico de los elementos ROSE. Los demás tallo-asa cercanos al 5', son termoestables y posiblemente participen en el correcto plegado de la estructura termolábil durante la transcripción²²⁶.

Recientemente se describió dentro del género *Pseudomonas* el elemento ROSE más pequeño, con solo 62 nt y una estructura secundaria de solo 2 tallo-asa²³⁵. Dicho elemento regula la traducción del gen *ibpA*, el cual codifica para la sHSP IbpA (Inclusion body-associated protein A). Sin embargo, y pese a la conservación a nivel de secuencia, las diferencias observadas en los niveles basales de expresión y la velocidad de inducción del ARNT de *ibpA* en las especies analizadas, sugieren que la producción de IbpA es parte de la adaptación ambiental²³⁵.

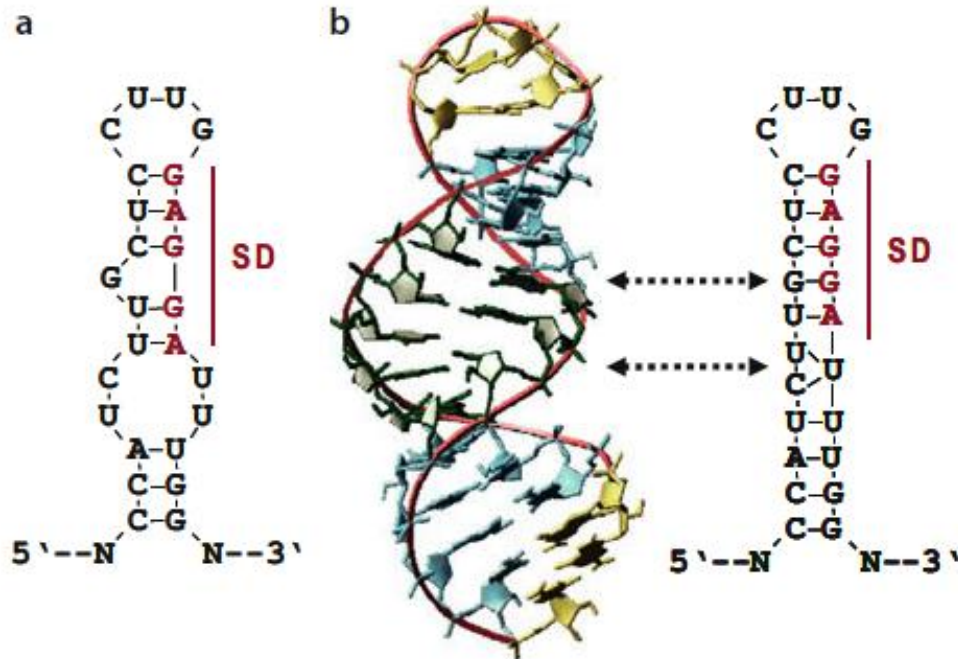


Figura 5. Estructura de tallo-asa que responde a la temperatura en el elemento ROSE de *B. japonicum*. (a) Predicción *in silico* del elemento ROSE usando el programa MFOLD bajas temperaturas (izquierda), la secuencia SD está indicada. (b) Estructura determinada por RMN de esta región. Las flechas señalan las regiones más termolábiles, en las cuales, da inicio la apertura de la estructura²³⁴.

Los elementos fourU, son otra clase importante de ARNT que controlan la traducción de sHsps y de factores de virulencia^{219,223,236}. Como su nombre lo indica, la característica más importante de estos elementos es un segmento de cuatro residuos de uracilo (U) consecutivos que atrapan al SD²¹⁹. El fourU más estudiado se encuentra en la 5'-UTR del gen *agsA* de *S. enterica* serovar Typhimurium y codifica para la chaperona AgsA (aggregation suppression protein A); tiene una longitud de 57 nt y la estructura secundaria está compuesta por 2 tallo-asa²¹⁹. A diferencia de los elementos ROSE, la SD está completamente apareada con las 4 U y junto con apareamientos estabilizantes y desestabilizantes alrededor del SD, forman la estructura que responde a la temperatura, el tallo-asa del 3'. Así mismo, la apertura de este elemento, la cual ocurre por el mecanismo de cremallera, está influenciada también por las concentraciones fisiológicas de Mg²⁺ y por estudios de RMN, se determinó que la unión cooperativa de este elemento involucra dos sitios de la porción termosensora²²⁵(Tabla 1).

La búsqueda y predicción *in silico* de elementos similares ha permitido la identificación de posibles candidatos fourU, los cuales y al igual que *agsA*, están presentes en los ARNm de los genes de la HSR, *groES* y *dnaJ* de *Staphylococcus aureus* y *Brucella melitensis*, respectivamente. Sin embargo su verificación experimental y caracterización aún no se han reportado²¹⁹. Por otro lado, el ARNT más pequeño de este grupo de elementos se encontró en la 5'-UTR de los genes *htrA* (high temperature requirement A) de *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* sp y *Citrobacter koseri*²³⁷. Tiene, en el único tallo-asa de su estructura secundaria, el cual abarca 44 nt, elementos suficientes para funcionar como termosensor: 4 G que atrapan el SD y una citosina (C) desapareada, cuya delección reduce la traducción significativamente y estabiliza la estructura²³⁷. La proteína HspA, denominada también DegP o Proteasa Do, es una proteasa de periplasma con actividad de chaperona²³⁸.

Además de los elementos ROSE y fourU, otros ARNT no relacionados estructuralmente, regulan la expresión de genes implicados en la HSR, tales como *hspX* y *hspY* del operón *hspXYZ* de *P. putida*²³⁹ y *groES* del operón *groESL* de *Salmonella*, este último, conservado entre las enterobacterias como *Shigella dysenteriae* y *E. coli*²⁴⁰. Estos, al igual que el fourU que se encuentra en el operón *yscW-lcrF* de *Yersinia* y controla la producción del regulador maestro de virulencia LcrF, son los primeros ejemplos de termosensores de ARN que se han identificado en las regiones intergénicas y controlan diferencialmente la traducción de genes individuales en operones policistrónicos. Así, los ARNT son también un mecanismo de control

frecuentemente utilizado por las bacterias para regular de manera selectiva los componentes de complejos proteicos implicados en la respuesta a estímulos ambientales y en la adaptación a un determinado ambiente²³⁹.

Termómetros de ARN y la CSR

Es importante mencionar que también existen ARNT cuya actividad no se da a través del mecanismo de apertura tipo cremallera, sino que funcionan como un interruptor (**switch**) de encendido (**ON**) y apagado (**OFF**) a través de dos estructuras mutuamente excluyentes, mecanismo propio de los riboswitches, los cuales regulan positivamente la traducción de proteínas a bajas temperaturas^{217,218}. Un ejemplo para esta clase, considerado como el primer termómetro descrito en la literatura, corresponde al gen *cIII*, cuyo producto es esencial en la decisión del fago λ de *E. coli* para entrar a la fase lítica o lisogénica después de la infección²¹⁸. *cIII* sirve como sustrato alternativo de la proteasa FtsH, la cual degrada también la proteína *cII*, un regulador central de la fase lisogénica; altas concentraciones de *cIII*, estabilizan a *cII* y promueven la lisogenia. Un segmento que abarca 85 nt del 5'-URT y 45 de la región codificante del ARNm de *cIII*, adopta una de dos estructuras alternativas A o B, las cuales dependen de la temperatura y determinan la traducción. A temperaturas inferiores a 37 °C, la estructura B es dominante y libera el SD permitiendo la traducción; por tanto, se produce más *cIII* y la fase lisogénica es positivamente regulada. Si la temperatura se incrementa (45°C), la estructura A es predominante y atrapa parte de la secuencia RBS y el codón de inicio de *cIII*, impidiendo su traducción. Esto resulta en la reducción de *cII* y la entrada del fago en la fase lítica. Adicionalmente, la presencia de Mg²⁺ podría tener un papel estructural en este termómetro; *in vitro*, concentraciones inferiores a 0.5 mM hacen que el equilibrio se desplace hacia la forma A y el aumento de este catión, favorece la estructura B. El control de la actividad del fago λ por la temperatura está posiblemente relacionado con las condiciones fisiológicas de la célula y factores ambientales²¹⁷.

Otro ARNT que funciona con el mecanismo previamente descrito se encuentra en ARNm del gen *cspA*, el cual codifica para una de las principales proteínas de la CSR de *E. coli* y es el primer ejemplo de una estructura de ARN que incrementa la expresión de un gen en respuesta al choque por frío. CspA es una chaperona de ácidos nucleicos y se une tanto al ADN como al ARN de cadena sencilla y evita la formación estructuras secundarias^{218,242}. A

temperaturas cercanas a 37°C, el ARNT de *cspA* abarca 160 nt de la 5'-UTR y recluta además los primeros 60 de la región codificante, formando una estructura que secuestra el SD y el codón de inicio, inhibiendo la traducción del mismo. Adicionalmente, el transcrito a 37°C es muy poco estable y susceptible a la degradación por ribonucleasas. Cuando la temperatura disminuye (10°C-20°C), el ARNT sufre un rearrreglo estructural importante, exponiendo el SD y ubicando el codón de inicio en una estructura de tallo poco estable. La nueva estructura le confiere estabilidad al transcrito y permite el acceso de los ribosomas²¹⁸.

Termómetros de ARN y el control de factores de virulencia

Para la mayoría de las bacterias patógenas, el incremento de la temperatura cercano a 37°C es una señal que indica la entrada exitosa a sus hospederos mamíferos susceptibles y una condición en la que se induce la expresión de los factores de virulencia.

La primera evidencia de que los ARNT regulan también la producción de factores de virulencia, particularmente al inicio de la cascada y a través del control de los reguladores maestros, se encontró en el 5'-UTR del gen *lcrF* de *Yersinia pestis*²⁴³. LcrF es un regulador que activa la transcripción de genes que codifican importantes factores de virulencia tales como la adhesina YadA, el SST3 y los efectores Yops (*Yersinia* outer proteins). Los genes *yscW* y *lcrF* forman un operón y su transcripción es reprimida por la proteína YmoA a bajas temperaturas (25°C); sin embargo, el gen *lcrF* es transcrito a un nivel bajo pero su traducción es bloqueada por la formación de una estructura secundaria en el 5'-UTR que atrapa el SD. A 37°C la proteína YmoA es rápidamente degradada por proteasas, permitiendo la transcripción del operón *yscW-lcrF* y la estructura que precede a *lcrF* sufre un cambio conformacional que permite su traducción; así la síntesis de LcrF y la expresión de los genes regulados por este factor se incrementa en respuesta a la temperatura^{201,243,244}. La estructura secundaria de la 5'-UTR de *lcrF* abarca 123 nt y tiene 2 formas tallo-asa. El SD está completamente apareado por un elemento **fourU** y junto con el AUG, son atrapados en el tallo-asa 3'. Su mecanismo de apertura es del tipo cremallera y varios apareamientos A-U y G-U al igual que dos "loops" asimétricos internos, conforman la estructura termosensora cuya apertura ocurre a temperaturas de sus hospederos²⁴⁴ (Tabla 1).

En *L. monocytogenes*, la activación de los genes de virulencia está bajo el control del activador transcripcional PrfA, cuya expresión es termorregulada. El gen *prfA*, tiene en su 5'-UTR una estructura secundaria de 127 nt compuesta por un extenso tallo-asa e interrumpido

por diversas asas internas; a diferencia de otros ARNT, la SD y el AUG no están apareados sino parcialmente expuestos; sin embargo, la conformación de esta estructura es lo suficiente estable para bloquear la traducción a bajas temperaturas ($\leq 30^{\circ}\text{C}$). Además, este ARNT no está relacionado estructuralmente con los elementos anteriormente descritos (Tabla 1). A 37°C , la estructura de tallo-asa se desestabiliza, permitiendo el inicio de la traducción²⁴⁵; sin embargo, la expresión de *prfA* es compleja e involucra a SreA, un ncRNA producido por el riboswitch de SAM (S-adenosil metionina). SreA, se une a una porción del 5'-UTR de *prfA* (80 nt corriente arriba del SD) reprimiendo su expresión y dicha unión ocurre solo a 37°C , cuando la estructura está abierta; no obstante PrfA regula la expresión misma de SreA, creando un circuito de regulación. Así, el control diferencial en la producción de factores importantes para la virulencia, estaría determinado por la disponibilidad de nutrientes, cuya concentración, tal como ocurre con SAM, varía en los diferentes compartimentos del huésped²⁴⁶.

Durante el proceso de infección, las bacterias patógenas deben captar hierro para asegurar su supervivencia. Para tal fin, y debido a que la disponibilidad de este elemento en los huéspedes humanos es limitada, las bacterias han desarrollado diversos sistemas especializados para su obtención. *Shigella dysenteriae* posee un único sistema de captación denominado Shu (Shigella Heme Uptake) con el cual toma los grupos hemo y proteínas que lo posean como fuente de hierro²⁴⁷. Un ortólogo de este sistema está presente sólo en cepas de *E. coli* patógenas, enteropatogénica-EPEC y enterohemorrágica-EHEC y es denominado Chu (*E. coli* haem utilization). Las proteínas ShuA y ChuA, las cuales hacen parte de los sistemas Shu y Chu, respectivamente, son receptores de la membrana externa que unen e importan grupos hemo al periplasma; por tanto su producción está controlada por la disponibilidad de hierro: a altas concentraciones, la transcripción del gen *shuA* es reprimida por el factor Fur. Aunque la limitación de hierro promueve la transcripción de *shuA*, los niveles de ShuA solo se incrementan a 37°C y no a temperaturas inferiores²⁴⁷. Un elemento fourU, el cual atrapa el SD en un pequeño tallo-asa en el 3', es la porción termosensora de una extensa estructura secundaria que se forma 5'-UTR de *shuA* (alrededor de 300 nt) y regula la traducción de este gen, en respuesta a incrementos en la temperatura (Tabla 1). Dicho elemento fourU y las regiones adyacentes al mismo, están altamente conservados en *chuA* de las cepas patógenas de *E. coli* y también termorregulan su traducción. Finalmente, la regulación combinada de la expresión de *shuA/chuA* por Fur y un ARNT asegura que la síntesis de ShuA/ChuA se dé bajo

condiciones exclusivamente asociadas al huésped: limitaciones de hierro, presencia de grupos hemo y 37°C²⁴⁷.

Neisseria meningitidis, también conocida como meningococo, es un comensal inocuo de las vías respiratorias altas de los humanos y cuando logra ingresar al torrente sanguíneo, causa septicemias y meningitis. Para evadir el sistema inmune, esta bacteria utiliza estrategias como la síntesis de una cápsula de polisacárido, la sialilación del LPS y el reclutamiento del factor H del complemento, entre otros; además, la producción de estos factores está regulada por la temperatura. Recientemente, se reportó la existencia de tres ARNT independientes que controlan a nivel de la traducción la expresión de los genes, *ccsA*, *lst* y *fHbp*, los cuales codifican para una enzima de la síntesis de la cápsula, una sialil-transferasa y la lipoproteína fHbp (proteína de unión al factor H del suero humano), respectivamente²²¹. Particularmente, en la 5'-UTR del gen *ccsA* de aislados silvestres de *N. meningitidis*, hay una secuencia duplicada de 8 nt ubicada a 15 nt corriente arriba del AUG; esta secuencia, es fundamental para el funcionamiento del ARNT y hace parte de una estructura secundaria de 110 nt que atrapa el SD (Tabla 1). Así, acorde con el mecanismo de apertura tipo cremallera, la síntesis de la cápsula se incrementa de manera gradual y en respuesta a un aumento de la temperatura del huésped. Sin embargo, en aislamientos de *N. meningitidis* resistentes a la eliminación por el complemento del suero humano, el incremento en los niveles de CcsA, aún a bajas temperaturas, es consecuencia de la delección una copia de 8 nt ($\Delta 8$)²²¹. Dicha $\Delta 8$, disminuye la estabilidad de la estructura, libera el SD y permite el acceso a la maquinaria de traducción. No obstante, la termorregulación de *ccsA* en la mayoría de los ARNT $\Delta 8$, es restaurada mediante polimorfismos compensatorios en la copia de 8 nt restante; por tanto, la producción de este factor dependiente de la temperatura es de suma importancia en esta bacteria.

Respecto de los ARNT de los genes *lst* y *fHbp*, su funcionalidad se demostró experimentalmente, pero no están relacionados a nivel de estructura con los reportados hasta la fecha.

A diferencia de otros patógenos, esta bacteria se encuentra en su hospedero y no está sometida a cambios drásticos de temperatura; por consiguiente, no requiere de una señal que le indique la entrada exitosa al mismo. Por otro lado, un incremento moderado de temperatura (42°C) asociado a la inflamación e inducido por virus u otros patógenos respiratorios, es una señal de alarma para *N. meningitidis*, ya que podría ser erradicado simultáneamente del hospedero por el sistema inmune. Así, la inducción de mecanismos de

evasión inmune en respuesta a la elevación de la temperatura, es un mecanismo de supervivencia en procesos de co-infección con otros patógenos y una ventaja cuando la bacteria causa procesos infecciosos a nivel sistémico²²¹.

La leptospirosis, una zoonosis de amplia distribución geográfica, es causada por la espiroqueta *Leptospira interrogans* y otros miembros patogénicos del género *Leptospira*. En sus reservorios ambientales, animales mamíferos de cría y domésticos asintomáticos, la bacteria permanece en el sistema renal y es eliminada al ambiente a través de la orina. La transmisión al humano ocurre por el contacto de la piel erosionada o mucosas con animales infectados, suelos o aguas contaminadas. Las infecciones por esta bacteria, provocan desde episodios febriles hasta insuficiencia renal o hemorragia pulmonar, las cuales pueden ser letales.

Dos lipoproteínas putativas, denominadas LigA y LigB, facilitan el proceso de colonización de *L. interrogans*, mediante la unión a componentes de la matriz extracelular, la inhibición de la coagulación y la captura de los reguladores del complemento; además, la síntesis de estas dos adhesinas está regulada por la temperatura a través de un ARNT²²². Una región de 175 nt del 5'-UTR del ARNm y los seis primeros codones de la región codificante, cuya secuencia es idéntica en *ligA* y *ligB*, se pliegan en una estructura secundaria, formada por dos tallo-asa, separados por un segmento de cadena sencilla de 22 nt; pero, la estructura cercana al 5', la cual atrapa el SD y contiene solo 42 nt del 5'UTR, es suficiente para regular la traducción en respuesta a variaciones de la temperatura (Tabla 1). A 37°C, los niveles de LigA y LigB, respecto de los obtenidos cuando la bacteria se crece a 30°C, se incrementan 20 y 14 veces, respectivamente; sin embargo, la inducción de la expresión de ambas proteínas ocurre en presencia de NaCl 50mM y solo a 30°C. Pese a no tener relación estructural con los demás ARNT reportados, el mecanismo de apertura de *ligA/ligB*, es de tipo cremallera y la secuencia de la cadena opuesta al SD, es importante para estabilizar la estructura a bajas temperaturas²²².

Recientemente, un ARNT perteneciente a los elementos fourU, se describió como un mecanismo adicional de control en la expresión de factores de virulencia en *Vibrio cholerae*²²³. Esta bacteria, es la causante de la enfermedad diarreica del cólera e infecta al humano a través del consumo de agua contaminada; una vez en el intestino y en respuesta a incrementos de la temperatura (37°C), se induce la producción del regulador transcripcional ToxT. Así mismo, ToxT regula positivamente la transcripción de los genes *ctx* y *tcp*, los cuales codifican para los principales factores de virulencia: la toxina de cólera (CT) y el pili (TCP), respectivamente.

TCP, es requerido para la colonización del intestino y funciona como adhesina y CT induce evacuaciones acuosas y profusas, principal síntoma de esta enfermedad. El ARNT que controla la traducción de *toxT*, abarca 71 nt del 5'-UTR; la estructura secundaria comprende un único tallo-asa, en el cual el SD está apareado por cuatro U, principal característica de los elementos fourU²²³ (Tabla 1). Al igual que los demás elementos de esta clase, la estabilidad de la estructura depende de apareamientos canónicos y no canónicos con la SD, permitiendo su apertura gradual, acorde con el mecanismo de cremallera; sin embargo a temperaturas inferiores a 25°C, la traducción de *toxT* es completamente abatida. Este mecanismo, añade un elemento de control y garantiza la producción de factores de virulencia en la condición adecuada, cuando *V. cholerae* ingresa al intestino²²³.

Tabla 1. Termómetros de ARN (ARNT) que participan en la regulación de los factores de virulencia en diferentes bacterias patógenas^a.

Estructura del ARNT	Gen(es) regulados/Función	Especies bacterianas	Referencia(s)
	<p><i>hspA</i></p> <p>Heat shock proteína A</p> <p>ROSE</p>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	[216, 232]
	<p><i>rhlA</i></p> <p>Rhamnosil transferasa Biosíntesis de rhamnolípidos Respuesta QS</p> <p>ROSE</p>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Este trabajo
	<p><i>lasI</i></p> <p>Sintasa de AI 3-O-C₁₂-HSL Respuesta QS</p> <p>ROSE-like</p>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Este trabajo
	<p><i>agsA</i></p> <p>sHSP Chaperona</p> <p>FourU</p>	<i>Salmonella enterica</i>	[219, 225]

Tabla 1. Continuación

Estructura del ARNT	Gen(es) regulados/Función	Especies bacterianas	Referencia(s)
	<p><i>lcrF / virF</i></p> <p>Activador transcripcional</p> <p>FourU</p>	<p><i>Yersinia pestis</i></p> <p><i>Yersinia Pseudotuberculosis</i></p>	<p>[243, 220]</p>
	<p><i>shu / chu</i></p> <p>Sistema de captación de grupo Hemo</p> <p>FourU</p>	<p><i>Shigella dysenteriae</i></p> <p><i>Escherichia coli</i> patógenas</p>	<p>[247]</p>
	<p><i>toxT</i></p> <p>Activador Transcripcional</p> <p>FourU</p>	<p><i>Vibrio cholerae</i></p>	<p>[223]</p>
	<p><i>ligA, ligB</i></p> <p>Multiadhesinas</p>	<p><i>Leptospira interrogans</i></p>	<p>[222]</p>

Tabla 1. Continuación

Estructura del ARNT	Gen(es) regulados/Función	Especies bacterianas	Referencia(s)
	<p><i>prfA</i></p> <p>Activador Transcripcional</p>	<p><i>Listeria monocytogenes</i></p>	<p>[245, 246]</p>
	<p><i>cssA</i></p> <p>Biosíntesis de exopolisacáridos</p>	<p><i>Neisseria meningitidis</i></p>	<p>[221]</p>

^a Los sitios de inicio de la traducción y la secuencia SD, están señalados en color rojo y verde, respectivamente. Bases o regiones, establecidas experimentalmente como importantes para la función de termómetro, se indican en color azul. La clasificación de acuerdo a su estructura, está en negrita.

2. ANTECEDENTES

En relación a factores ambientales, la adaptación y la coordinación en la expresión génica es particularmente importante para un microorganismo como *P. aeruginosa*, capaz de colonizar diversos ambientes¹⁷. El cambio de vida libre a patógeno oportunista, requiere de la existencia de mecanismos que le permiten detectar tanto cambios de temperatura como factores adversos en los hospederos y responder a éstos eficientemente para su establecimiento. En *P. aeruginosa*, los primeros reportes de los efectos de la temperatura estuvieron relacionados con la composición de lípidos, lipopolisacáridos y proteínas de la membrana externa²⁴⁸; también con la expresión del operón *tolQRA*, implicado en el transporte de piocina y cuya inducción se observa a 37°C²⁴⁹; y con los cambios en el tamaño del canal de la principal porina OprF, cuyo diámetro se reduce a temperaturas subóptimas, probablemente, para prevenir la entrada de compuestos tóxicos y retener metabolitos esenciales²⁵⁰. Adicionalmente, se reportó la producción diferencial y dependiente de la temperatura, de las fenazinas PCN y su precursor, PCA (fenazina-1-ácido carboxílico), en la cepa ambiental M18 y en la cepa PAOI²⁵².

Así mismo, durante el desarrollo de la presente investigación, diversos análisis del transcriptoma de *P. aeruginosa*, demostraron que una buena parte (6.4-10.6%) del genoma de esta bacteria, incluyendo algunos genes regulados por QS y que codifican factores de virulencia, se regula en respuesta a los cambios de temperatura^{251,253-257}. No obstante, no se reportó un mecanismo molecular que explicara dicha termorregulación, sumado a diferencias importantes entre los resultados obtenidos en dichos reportes y atribuidas a condiciones experimentales: medios de crecimiento utilizados, densidad óptica de los cultivos, plataformas, métodos de análisis y cepas de *P. aeruginosa* utilizadas, entre otros.

Dado que la mayoría de los factores de virulencia, así como otros metabolitos secundarios que produce *P. aeruginosa* para causar una infección están regulados por el sistema de QS y en experimentos previos realizados en el laboratorio se evidenció el efecto de la temperatura sobre la producción de PCN y ramnolípidos, ambos regulados por RhlR, se propuso que los efectos y los mecanismos de termorregulación podrían estar asociados directamente a este mecanismo de respuesta.

En el contexto del QS y particularmente en el regulón RhlR, no se conocen los efectos de la temperatura a nivel de la transcripción o de la traducción de sus componentes, ni el o los mecanismos moleculares que los describan. Respecto de las características del gen *rhlR*, se sabe que éste se encuentra ubicado inmediatamente después del operón *rhlAB* y su transcripción es activada por el complejo LasR¹¹⁷. Ochsner y colaboradores¹²⁸ describieron por análisis de la secuencia, un promotor (P1) de este gen, localizado en la porción intergénica entre *rhlB* y *rhlR* y que es activado por LasR. Posteriormente, la región promotora de *rhlR* fue estudiada con más detalle, demostrando que la regulación de este gen es compleja e involucra la participación de diferentes reguladores además de LasR y cuya activación está influenciada por la composición del medio de cultivo¹¹⁴. Se reportó la presencia de dos promotores en la región codificante de *rhlB* (P3 y P4) y un segundo promotor (P2) ubicado corriente arriba de P1. Así, P1 y P2 se activan por LasR, aunque la expresión de P2 es constitutiva. La activación de P3 es RpoN dependiente, aunque de forma indirecta, ya que no hay una secuencia de unión en la región promotora de *rhlR*. El regulador Vfr independiente de AMPc, activa positivamente a *lasR*¹⁵¹ y unido a AMPc, activa la transcripción de *rhlR* a través de la unión a diferentes elementos presentes en el promotor reconocidos por Vfr, uno de los cuales cercana a P4, tiene un efecto represor¹⁵⁴. Así mismo, *rhlR* es parte del policistrón *rhlAB-R* y autorregula su expresión a través de la unión de RhlR/C4-HSL al promotor presente en *rhlA*¹²⁹, creando un circuito de autorregulación positivo¹⁵⁴.

Por tanto, el principal aspecto a estudiar en el presente trabajo es el efecto que tiene el cambio de la temperatura en la respuesta QS de *P. aeruginosa*, específicamente en un medio de cultivo limitado en fosfatos, PPGAS (phosphate-limited / proteose peptone / glucosa / ammonium salts), en el cual se producen los ramnolípidos²⁵⁸. Así mismo, describir un posible mecanismo de termorregulación y proponer un modelo que integre a la temperatura dentro del esquema de regulación QS en *P. aeruginosa*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto que tiene la temperatura en la respuesta sensora de quórum (QS) de *P. aeruginosa* cepa PAOI.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto de la temperatura en la producción de los factores de virulencia dependientes del sistema RhlR/C4-HSL en *P. aeruginosa*, cepa PAOI.
2. Establecer posibles mecanismos postranscripcionales y dependientes de la temperatura que afecten la actividad regulatoria de RhlR.
3. Identificar los genes de *P. aeruginosa* cepa PAOI, en particular los asociados a la virulencia, cuya expresión se modifique por efecto de la temperatura mediante el análisis global de un transcriptoma.
4. Proponer un modelo que integre a la temperatura dentro del esquema de regulación del QS en *P. aeruginosa*

4. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Como resultado del presente trabajo, se publicaron los siguientes artículos:

1. María Victoria Grosso-Becerra, Christian Santos-Medellín, Abigail González-Valdez, José-Luis Méndez, Gabriela Delgado, Rosario Morales-Espinosa, Luis Servín-González, Luis-David Alcaraz and Gloria Soberón-Chávez. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC genomics* 15:318.
2. María Victoria Grosso-Becerra, Gerardo Croda-García, Enrique Merino, Luis Servín-González, Raúl Mojica-Espinosa and Gloria Soberón-Chávez. (2014). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by two novel RNA thermometers. *PNAS* 111: 15562-15567.
3. María Victoria Grosso-Becerra, Luis Servín-González and Gloria Soberón-Chávez. (2015) RNA structures are involved in the thermoregulation of bacterial virulence-associated traits. *Trends Microbiol* 23:509-518.

Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by two novel RNA thermometers

María Victoria Grosso-Becerra^a, Gerardo Croda-García^a, Enrique Merino^b, Luis Servín-González^a, Raúl Mojica-Espinosa^c, and Gloria Soberón-Chávez^{a,1}

^aDepartamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70228, Ciudad Universitaria, D.F. 04510, México; ^bDepartamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor. 62200, México; and ^cUnidad de Genotipificación y Análisis de Expresión, Instituto Nacional de Medicina Genómica, México, D.F. 14090, Secretaría de Salud, México

Edited by Stephen Lory, Harvard Medical School, Boston, MA, and accepted by the Editorial Board September 10, 2014 (received for review February 10, 2014)

In a number of bacterial pathogens, the production of virulence factors is induced at 37 °C; this effect is often regulated by mRNA structures formed in the 5' untranslated region (UTR) that block translation initiation of genes at environmental temperatures. At 37 °C, the RNA structures become unstable and ribosomes gain access to their binding sites in the mRNAs. *Pseudomonas aeruginosa* is an important opportunistic pathogen and the expression of many of its virulence-associated traits is regulated by the quorum-sensing (QS) response, but the effect of temperature on virulence-factor expression is not well-understood. The aim of this work is the characterization of the molecular mechanism involved in thermoregulation of QS-dependent virulence-factor production. We demonstrate that traits that are dependent on the QS transcriptional regulator RhlR have a higher expression at 37 °C, correlating with a higher RhlR concentration as measured by Western blot. We also determined, using gene fusions and point mutations, that RhlR thermoregulation is a posttranscriptional effect dependent on an RNA thermometer of the ROSE (Repression Of heat-Shock gene Expression) family. This RNA element regulates the expression of the *rhlAB* operon, involved in rhamnolipid production, and of the downstream *rhlR* gene. We also identified a second functional thermometer in the 5' UTR of the *lasI* gene. We confirmed that these RNA thermometers are the main mechanism of thermoregulation of QS-dependent gene expression in *P. aeruginosa* using quantitative real-time PCR. This is the first description, to our knowledge, of a ROSE element regulating the expression of virulence traits and of an RNA thermometer controlling multiple genes in an operon through a polar effect.

RNA thermometers | bacterial virulence | gene regulation | polarity | quorum sensing

A free-living γ -proteobacterium, *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most clinically important opportunistic pathogens. It is responsible for acute infections in immune-compromised individuals and is the primary cause of death in patients with cystic fibrosis (1). The wide pathogenic capacity of this bacterium depends on its ability to produce and secrete multiple virulence factors that are regulated at the transcriptional level by the quorum-sensing (QS) response (2). Several mechanistic details of this intricate regulatory network remain to be elucidated at the molecular level.

The QS response is mediated by the bacterial production of acyl-homoserine lactones (autoinducers) that act as signal molecules interacting with transcriptional regulators of the LuxR family. In *P. aeruginosa*, Las and Rhl QS regulation is arranged in a hierarchical cascade. LasR interacts with 3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone (3O-C12-HSL) produced by the LasI enzyme, and activates the transcription of several genes encoding virulence factors and also of *rhlR*, *lasI*, and *rhlI*; *rhlR* encodes the second QS transcriptional regulator, whereas the product of the *rhlI* gene is the enzyme that produces butanoyl-homoserine lactone (C4-HSL), which is the autoinducer that interacts with RhlR (2, 3). RhlR/C4-HSL in turn promotes the expression of

genes responsible for the production of several virulence factors. These include pyocyanin, whose biosynthetic enzymes are encoded by the two reiterated *phz* operons (4, 5), lectin PA-IL (product of *lecA*), and the *rhlAB* operon, encoding enzymes involved in the production of the biosurfactant rhamnolipids (2). Transcription of *rhlR* is driven by five promoters (*SI Appendix*, Fig. S1); four of the start sites are located immediately upstream of the gene (6), whereas the fifth promoter drives the synthesis of a large transcription unit that includes *rhlA*, *rhlB*, and *rhlR* (7). We will refer to this transcription unit as the *rhlAB-R* operon (*SI Appendix*, Fig. S1). We have demonstrated using genetic evidence and RT-PCR that *rhlR* can be part of an *rhlABR* polycistronic unit, implying that its transcription can be started from the *rhlA* promoter. Because RhlR activates this promoter, an RhlR-dependent positive autoregulatory loop is formed (7).

The *P. aeruginosa* QS response also involves the regulon that depends on the signal molecule 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolone (PQS) and the transcriptional regulator PqsR, which is not a member of the LuxR family of transcriptional regulators (2). The virulence traits that depend on PQS regulation are mainly produced by the enhancement of the RhlR-dependent QS response, giving rise to a complex network of positive and negative

Significance

Several bacteria that are pathogens of humans regulate the production of virulence factors in response to temperature changes, expressing them only at 37 °C. This thermoregulation is commonly due to the presence of RNA structures (RNA thermometers) in the 5' regions of transcripts specifying regulatory proteins responsible for the expression of virulence-associated traits. At environmental conditions, RNA thermometers possess structures that block translation initiation of mRNAs, whereas at body temperature these structures are no longer stable, allowing the synthesis of their corresponding proteins. We report for the first time, to our knowledge, the molecular basis of thermoregulation of virulence-factor production in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, and have determined that this regulation is achieved by two RNA thermometers with previously unidentified characteristics not previously reported in bacteria.

Author contributions: E.M., L.S.-G., and G.S.-C. designed research; M.V.G.-B. and G.C.-G. performed research; R.M.-E. contributed new reagents/analytic tools; M.V.G.-B., E.M., L.S.-G., and G.S.-C. analyzed data; and G.S.-C. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission. S.L. is a guest editor invited by the Editorial Board. Freely available online through the PNAS open access option.

Data deposition: The microarray data presented in this paper are Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME)-compliant and have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo (accession no. GSE45695).

¹To whom correspondence should be addressed. Email: gloria@biomedicas.unam.mx.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1402536111/-DCSupplemental.

interactions that exist between the LasR- and RhlR-dependent QS regulons (2).

Several human pathogenic bacteria produce virulence-associated traits only under conditions of infection, and in various instances temperature has been shown to play a major role in the regulation of their expression (8–10). In these cases, the production of virulence determinants is completely abrogated at environmental temperatures (30 °C or lower), whereas the genes encoding these factors are fully expressed at 37 °C. In many organisms, the modulation of the expression of genes encoding virulence-associated traits is achieved by RNA structures present in the 5' untranslated region (UTR) of genes encoding key transcriptional regulators (10, 11). Recently, it was reported that *P. aeruginosa* genes encoding virulence factors regulated by QS were induced at 37 °C, the human body temperature (12); however, the molecular mechanism for this thermoregulation has not yet been determined.

There are several examples in bacteria of genes regulated by temperature-induced changes in an RNA structure at the 5' UTR of their mRNAs (11, 13–16). Genes regulated by these so-called RNA thermometers code either for heat-shock proteins or for positive regulators of genes encoding virulence factors. There are several RNA structures that can function as thermometers (16). Some of the best-characterized microbial thermometers are the ROSE (Repression Of heat-Shock gene Expression) elements, which have only been reported in transcripts of genes encoding small heat-shock proteins present in several α - and γ -proteobacteria (17). The sequences of ROSE elements are not extensively conserved, but their structure consists of two, three, or four stem loops ranging from 60 to more than 100 nt in length. The 5' hairpin(s) remains folded at higher temperatures, whereas the 3' proximal stem loop that harbors the ribosome binding site or Shine–Dalgarno sequence (SD), and in some instances the AUG start codon, is stable only at low temperatures and melts as the temperature rises. Heat-induced structural changes to this 3' proximal stem loop expose the SD sequence, allowing ribosome binding and mRNA translation (18).

In this report, we show that the production of *P. aeruginosa* RhlR-dependent virulence factors is thermoregulated, increasing at 37 °C, and that this increment is caused by a higher RhlR concentration at this temperature. The central element involved in thermoregulation is a ROSE element present in the 5' UTR of

rhlA. At environmental temperatures (30 °C or lower), this RNA thermometer is predicted to be highly structured, blocking *rhlA* translation, causing a polar effect on transcription of *rhlB* and *rhlR* initiated at the *rhlA* promoter. The presence of this RNA thermometer had been predicted by in silico analysis of the PAO1 genome (15), but no experimental evidence has been provided until now. In addition, we identified an RNA thermometer in the 5' UTR of *lasI*, and we show that the translation of this gene is also increased at 37 °C, although this increase in translation results only in a marginal increment of 3O-C12-HSL levels. Finally, using quantitative real-time PCR, we verified that *P. aeruginosa* QS-dependent production of virulence factors is thermoregulated and that this response to temperature is dependent on the two RNA thermometers studied here, the ROSE element located in the 5' UTR of *rhlA* and a ROSE-like element in the 5' UTR of *lasI*.

Results and Discussion

Growth Temperature Modulates RhlR-Dependent Virulence-Factor Production in *P. aeruginosa*. To determine whether virulence-factor production was affected by growth temperature in *P. aeruginosa*, we measured rhamnolipid production at 37 °C and 30 °C and found it to be considerably higher when this bacterium is cultivated at body temperature (Fig. 1A), and also that this difference is due to a higher level of transcription of the *rhlAB-R* operon at 37 °C (Fig. 1B).

Because transcription from the *rhlAB-R* promoter is strictly activated by RhlR/C4-HSL, we wondered whether the growth temperature also affected other traits regulated by this protein–autoinducer complex. We found that pyocyanin production was also higher at 37 °C (Fig. 1A) and that the transcription of the *phzA1B1C1D1E1F1G1* operon, which is also dependent on RhlR/C4-HSL for its expression (4, 5), was strongly dependent on growth of the bacteria at 37 °C (Fig. 1B). Furthermore, transcription of *lecA* (the gene coding for PA-IL, a galactophilic lectin) is higher at 37 °C than at 30 °C (Fig. 1B). In contrast, the expression of virulence factors that are dependent on LasR/3O-C12-HSL was not significantly affected by growth temperature; for example, elastase expression was not significantly different when *P. aeruginosa* was grown at these temperatures (Fig. 1A).

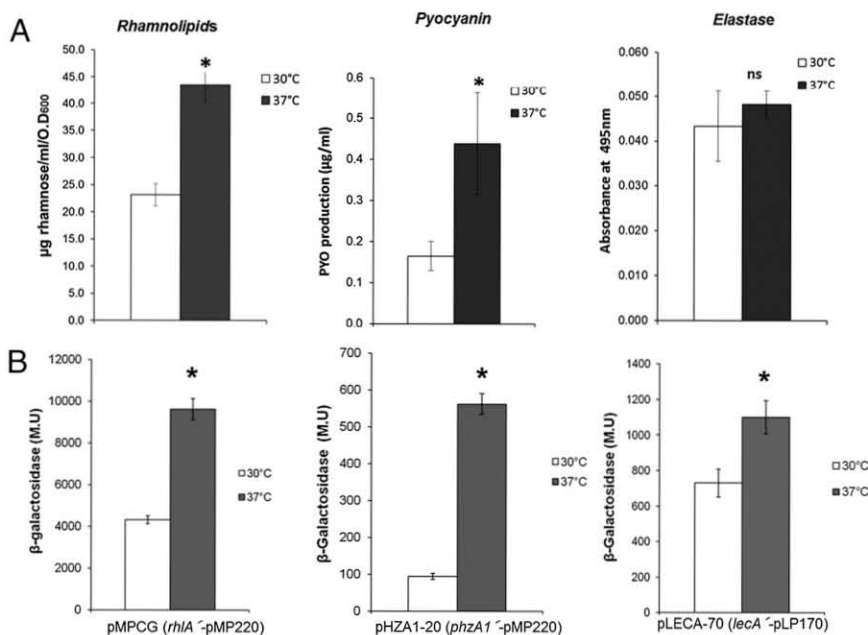


Fig. 1. Expression of RhlR-dependent virulence factors is thermoregulated. Production of several virulence-associated traits (A) and expression of several *lacZ* transcriptional fusions (B) when *P. aeruginosa* PAO1 was cultivated at 30 °C (white bars) and 37 °C (black bars) at OD_{600} 1.5. Rhamnolipids and pyocyanin were determined from cultures grown in PPGAS medium, and elastase activity was determined from cultures grown in LB medium at an OD_{600} of 1.5. Data shown are the average of at least three independent determinations, and the error bars represent SDs. * $P < 0.05$ by Student *t* test; ns, not significant. M.U., Miller units.

Intracellular Concentration of RhlR Is Thermoregulated. To determine whether the lower expression at 30 °C of the RhlR-dependent virulence-associated traits was due to a reduced RhlR concentration, we measured the level of this protein at 30 °C and 37 °C by means of western blot experiments. The results clearly show that RhlR concentration is considerably lower when *P. aeruginosa* is cultivated at 30 °C (Fig. 2A). This thermoregulation was not observed in the case of LasR (Fig. 2B), one of the main transcriptional regulators involved in *rhlR* expression as part of the QS response (SI Appendix, Fig. S1).

The reduced RhlR concentration at 30 °C is not due to a lower level of *rhlR* transcription from any of the four promoters located immediately upstream of this gene, because a strain that carries plasmid pSC1002 containing a *lacZ* fusion expressed from these four promoters produced similar levels of β -galactosidase along the *P. aeruginosa* growth curve at 30 °C and 37 °C (Fig. 3A).

As mentioned, the *rhlAB-R* operon is positively regulated by RhlR/C4-HSL, so a positive autoregulatory loop for *rhlR* expression is formed, resulting in full induction of the QS response (7). In the experiments of Fig. 3B, we show that this positive autoregulatory loop is only significant at 37 °C and not at 30 °C. In these experiments, we determined the expression of *rhlR* from the *rhlA* promoter in the presence of plasmid pGMYC, which codes for *rhlR* expressed under the *lacZ* promoter (SI Appendix, Table S1), by measuring the β -galactosidase activity in an *rhlR*::Tn'*lacZ* mutant (PW6882; SI Appendix, Table S1) that has an in-frame *lacZ* chromosomal insertion (Fig. 3B). The higher expression at 37 °C of chromosomal *rhlR* was not due to an increased expression of RhlR, because the concentration of this protein expressed from plasmid pGMYC was the same at both temperatures (Fig. 3C).

To further confirm that the higher RhlR concentration at 37 °C than at 30 °C in the PAO1 strain was determined by

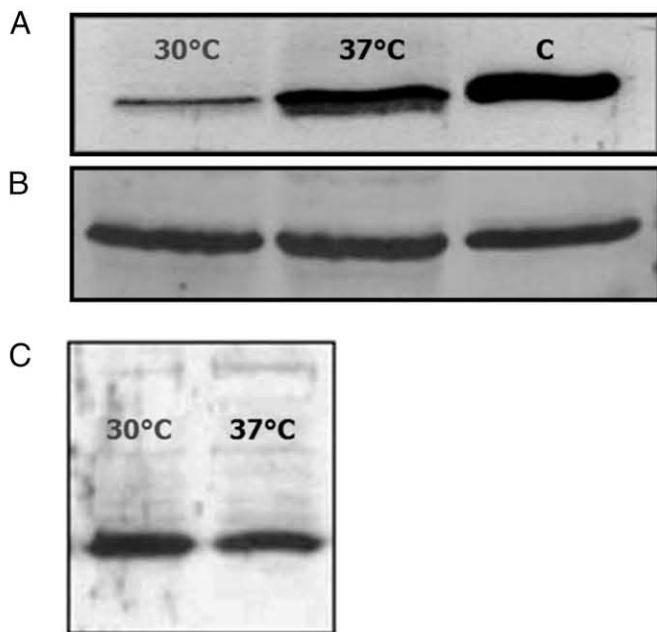


Fig. 2. Effect of *P. aeruginosa* growth temperatures (30 °C and 37 °C) on RhlR and LasR intracellular concentration. Protein concentrations were determined by Western blot analysis. (A) RhlR concentration in extracts of PAO1 cells grown at OD₆₀₀ 1.5 on PPGAS medium at 30 °C and 37 °C. C, control. (B) LasR concentration in extracts of PAO1 cells grown to an OD₆₀₀ of 1.5 on PPGAS medium at 30 °C and 37 °C. The same protein (RhlR or LasR) expressed in *E. coli* was used as the control. (C) RhlR concentration in extracts of PAO1-derived *rhlA*::*Gm* mutant grown at OD₆₀₀ 1.5 on PPGAS medium at 30 °C and 37 °C. Protein concentrations were determined in at least two independent experiments.

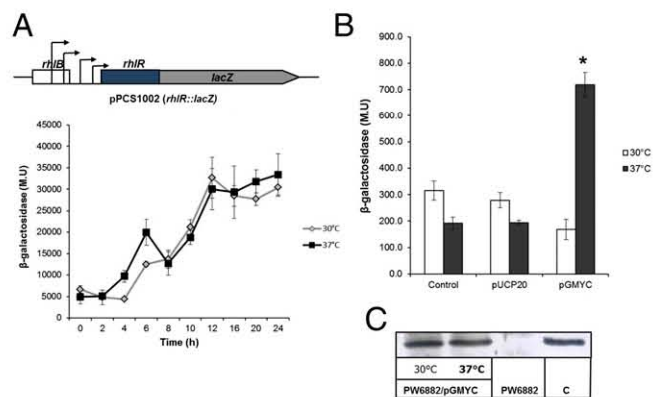


Fig. 3. Temperature-dependent expression of *rhlR* in *P. aeruginosa* depends on the transcription of the *rhlAB-R* operon at 37 °C. (A) Diagram of plasmid pSC1002, which encodes for an *rhlR-lacZ* transcriptional fusion (containing the four *rhlR* immediately upstream promoters), and the expression of this *rhlR-lacZ* fusion in *P. aeruginosa* PAO1 at 30 °C (gray line) and 37 °C (black line). (B) Expression of *rhlR* from the *rhlA* promoter in strain PW6882, which contains an in-frame Tn9-*lacZ* insertion inside *rhlR* (SI Appendix, Table S1) at 30 °C (white bars) and 37 °C (gray bars). The first set of bars at both temperatures represents the basal expression of chromosomal *rhlR*; the second set of bars corresponds to the expression of this gene in the presence of the promoter in strain PW6882, with cloning vector pUCP20 (used as control of *rhlR* LasR-dependent expression); and the third set of bars at each temperature represents the expression with plasmid pGMYC (SI Appendix, Table S1) expressing *rhlR* *in trans*. **P* < 0.05 by Student *t* test. (C) RhlR concentration was determined by Western blot analysis, expressed from plasmid pGMYC. The samples were the same as those used for β -galactosidase determination in B.

thermoregulation of *rhlR* expression when its transcription starts at the *rhlA* promoter, we determined the intracellular RhlR level in a PAO1 *rhlA*::*Gm* mutant (SI Appendix, Table S1). We used this mutant, because the inactivation of *rhlA* by the insertion of a *Gm* cassette causes a polar effect on the transcription of *rhlB* (19, 20) and its expression is abrogated. We reasoned that if *rhlR* induction at 37 °C is driven from the *rhlA* promoter, thermoregulation of *rhlR* would also be abrogated in the *rhlA*::*Gm* background. Indeed, in the *rhlA*::*Gm* mutant, the RhlR concentration was not dependent on the growth temperature, unlike in the wild-type strain (Fig. 2C). This result confirms that the increased *rhlR* expression at 37 °C is driven from the *rhlA* promoter. Furthermore, the concentration of RhlA itself is also thermoregulated (SI Appendix, Fig. S2).

A ROSE Element Is Responsible for Thermoregulation of the *rhlAB-R* Operon. To determine whether an mRNA structure could determine thermoregulation, we analyzed the *rhlA* 5' UTR using mfold version 3.2 (21) and the RNAfold program of the Vienna RNA package (22). These analyses revealed the presence of a putative ROSE RNA thermometer that contains all of the reported characteristics shown by these elements (14), including an unpaired G in the middle of the 3' proximal stem (SI Appendix, Fig. S3A). As previously mentioned, this putative RNA thermometer has already been predicted by bioinformatic analysis of the *P. aeruginosa* genome (15) and is highly conserved in all of the available *P. aeruginosa* sequenced genomes (SI Appendix, Fig. S4) (23). In addition, this RNA structure in the *rhlA* 5' UTR has been recently proposed to be the site of regulation of a small RNA that participates in nitrogen regulation (24).

The structure of one ROSE element has been elucidated using NMR. In this structure, the 3' proximal stem loop is responsible for thermoregulation, and the deletion of a highly conserved unpaired G residue in this stem loop leads to the formation of a stable RNA helix without thermosensing ability (14, 18). Although there is no experimental evidence of participation of the

5' proximal stem loop(s) in the functionality of ROSE elements, their conservation suggests that they might be important in the proper folding of the 3' proximal temperature-responsive stem loop, which contributes to the regulation of expression of genes for small heat-shock proteins (11, 25, 26).

We therefore decided to determine whether the ROSE element present in the 5' UTR of *rhlA* was indeed required for thermoregulation of the translation of *rhlA* by using a biosensor and by constructing point mutations that affect nucleotides that have been shown to be relevant for the function of other ROSE elements (17, 25).

The pBAD18-*lacZ*481-based RNA-thermometer biosensor (17) that contains 36 nt of the putative *rhlA* ROSE element (we call this sequence "small ROSE") is called plasmid pBO-*rhlA*; it includes the proximal 3' stem loop and the AUG start codon (nucleotides 74–109 of the ROSE element; Fig. 4 I, A). We found that the *lacZ* reporter gene in pBO-*rhlA* was expressed at a reduced level at 30 °C and that expression was higher at 37 °C, as expected for a construct containing an RNA thermometer, because the translation of the *lacZ* reporter gene is thermoregulated (Fig. 4 I, B). On the other hand, we observed that a mutant in which the characteristic 3' proximal stem loop of the ROSE element was disrupted by unpairing (G92A) expressed high levels of β -galactosidase at 30 °C and at 37 °C (Fig. 4 I, B). Furthermore, using this plasmid, we showed that a mutant lacking the unpaired G (Δ G78) presented an extremely reduced expression both at 30 °C and at 37 °C (Fig. 4 I, B). The much higher level of expression from the plasmid carrying the G92A mutation compared with plasmid pBO-*rhlA* at both temperatures shows that the ROSE element partially controls *rhlA* translation even at 37 °C (the G92A mutation does not modify the sequence of the ribosome binding site; SI Appendix, Fig. S3A).

Similar experiments were undertaken using plasmid pBOC-*rhlA*, which contains the complete ROSE element present in the *rhlA* 5' UTR. These constructs gave results similar to those obtained with the small ROSE but with a lower level of expression (SI Appendix, Fig. S5).

The presence of the ROSE element explains the lower level of expression of *rhlA* at 30 °C due to a reduced level of translation at this temperature, which is reflected in a lower concentration of this protein (SI Appendix, Fig. S2). In addition, the thermoregulation observed in the expression of the downstream *rhlR* gene (Fig. 3B), and the lack of thermoregulation of RhlR concentration on an *rhlA* insertion mutant (Fig. 2C), was evidence of the presence of a mechanism that couples *rhlA* translation with the transcription of the *rhlAB-R* operon, presumably by a polar effect. To obtain additional evidence on the possible polar effect exerted by the *rhlA* ROSE element, we used a biosensor with a 5' *rhlA* small-ROSE element followed by the entire *rhlA* coding region and an in-frame *rhlB-lacZ* fusion starting at the AUG codon of *rhlB* (pBO-*rhlA,rhlB*). This construct showed thermoregulation of *lacZ* expression (Fig. 4 I, C), making it evident that the polar effect on *rhlB* is due to the lack of translation of *rhlA* at 30 °C. It is important to stress that there is no apparent transcriptional terminator between *rhlB* and *rhlR* that might explain termination of transcription when *rhlA* translation is reduced.

A deletion derivative of this plasmid called pBO- Δ *rhlA,rhlB* that lacks 326 nt (+548 to +873), which corresponds to approximately one-third of the *rhlA* coding region, loses *rhlB* thermoregulation, because it is expressed at the same level at 30 °C and at 37 °C (Fig. 4 I, C). These results show that polarity exerted by lack of *rhlA* translation on *rhlB* expression is due to putative termination structures formed on the *rhlA* mRNA in the absence of attached ribosomes, which prematurely terminate transcription of the operon.

To show that the thermoregulation of the QS response was mainly due to different *rhlR* expression at different temperatures, and not to an indirect effect of LasR concentration, we used the same vector designed to characterize the *rhlA* RNA thermometers (pBAD18-*lacZ*481; SI Appendix, Table S1) with

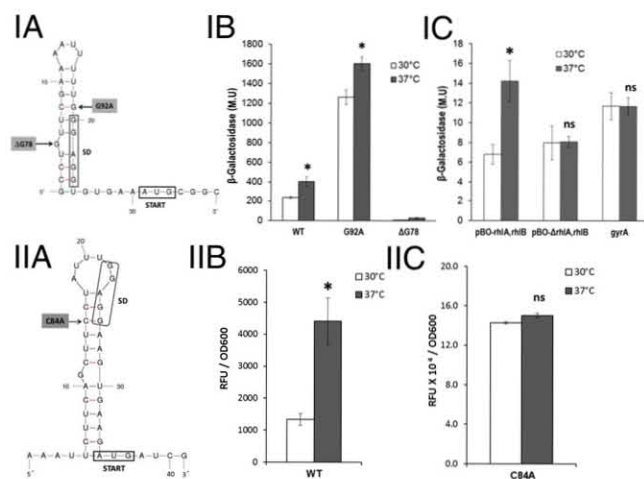


Fig. 4. Characterization of RNA thermometers present in the 5' UTR of *rhlA* and *lasI*. The proximal secondary structures of the 5' UTRs of the *rhlA* (I, A) and *lasI* (II, A) mRNAs predicted by mfold program version 3.2 corresponding to the small-ROSE elements are shown; numbers shown for the mutated nucleotides correspond to positions in the complete versions of both structures that are shown in SI Appendix, Fig. S3 A and B. (I, B) β -Galactosidase activity levels of cells harboring plasmids with different versions of the small-ROSE element at the 5' UTR region of *rhlA* fused to *lacZ* (pBO-*rhlA*). (I, C) Evaluation of the polar effect of *rhlA* on the temperature-dependent expression of *rhlB* and the negative control of the pBAD18-*lacZ*481-based RNA-thermometer biosensor carrying the *E. coli gyrA* (*pBO-gyrA*). (II, B) Characterization of the ROSE-like element at the 5' UTR region of *lasI*. (II, C) Characterization of its derivative with the mutation C84A [pBOC-*lasI* (C84A)]. Because expression of the constructs containing the *lasI* ROSE-like element was low, it was necessary to use a β -galactosidase activity assay with a fluorescent substrate for its characterization (SI Appendix, Materials and Methods). The fluorescence detected is expressed as arbitrary fluorescence units (RFUs) and normalized with respect to OD₆₀₀. Cells of *E. coli* DH5 α transformed with the corresponding plasmids were grown at 30 °C in LB broth until exponential phase (optical density of 0.5 at 600 nm). After addition of 0.04% L-arabinose, half of the culture was maintained at 30 °C (white bars) and the other half was transferred to 37 °C (gray bars) for 60 min before measuring β -galactosidase activity. The results expressed in Miller units are the average of three independent experiments with the respective SDs. **P* < 0.05 by Student *t* test.

a cloned insert corresponding to 110 bp of the 5' *lasR* UTR (pBOC-*lasR*; SI Appendix, Table S1) that is not predicted to contain an RNA thermometer. Furthermore, neither the LasR concentration, as measured by Western blot (Fig. 2B), nor *lasR* transcription, as determined by quantitative PCR (Fig. 5), was affected by growth temperature. As expected, the level of β -galactosidase activity encoded by plasmid pBOC-*lasR* was not affected by growth temperature (SI Appendix, Fig. S6).

As a negative control for all experiments that measured thermoregulation based in plasmids derived from pBAD18-*lacZ*481, we used a construct that contains the 5' UTR of the *Escherichia coli gyrA* gene that has already been used as a negative control (15). We found that β -galactosidase expression of this plasmid is not significantly different at 30 °C and 37 °C (Fig. 4 I, C). This result shows that β -galactosidase activity is not affected by growth temperature. However, different constructs based on plasmid pBAD18-*lacZ*481 show a different level of basal *lacZ* expression at 30 °C, presumably depending on specific features, including SD sequences, of each 5' UTR tested in each biosensor.

Thermoregulation of Autoinducer Production. The concentration of autoinducers is an important regulatory aspect of the *P. aeruginosa* QS response, so we were interested to determine whether it was affected by growth temperature. However, because the expression

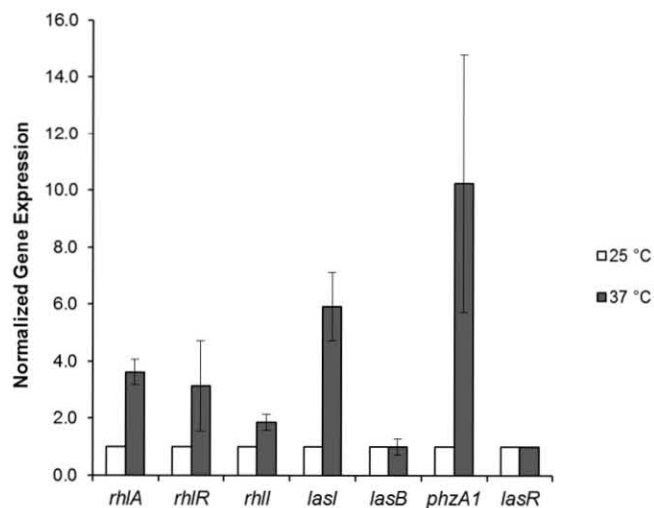


Fig. 5. Gene expression at 25 °C and 37 °C determined by quantitative real-time PCR. Total RNAs were prepared from strain PAO1 cells grown at 25 °C (white bars) and 37 °C (gray bars) in PPGAS medium. Cultures were harvested at an OD₆₀₀ of 1.5. The levels of transcripts were measured by quantitative real-time RT-PCR and normalized to *lasR* expression. The values represent the means and SDs of changes in comparison with the transcription level in PAO1 cells grown at 25 °C. All results are the average of at least three independent determinations, and the error bars represent SDs.

of autoinducer synthases LasI and RhlI is dependent on the transcriptional activation of the genes encoding these enzymes (*lasI* and *rhlI*) by LasR/3O-C12-HSL (2, 3) and because LasR concentration was not affected by growth temperature, we did not expect to see a significant increase in their concentration at 37 °C. Unexpectedly, we detected a slight increase in 3O-C12-HSL concentration and a substantial increase in C4-HSL concentration at 37 °C (SI Appendix, Fig. S7). To discard the effect of the increased concentration of RhlR at 37 °C on the production of autoinducers, we measured C4-HSL production in an *rhlR* mutant at both temperatures and observed a result similar to that obtained in the wild-type strain (SI Appendix, Fig. S7). These results suggest that some traits regulated by LasR/3O-C12-HSL, such as the production of autoinducers, and especially of C4-HSL, are also thermoregulated. However, because multiple metabolic steps are involved in the production of autoinducers, it could not be ruled out that the thermoregulation of their concentration might be due to higher metabolic rates at 37 °C.

A Second RNA Thermometer Is Present in the *lasI* 5' UTR. To determine whether the expression of the genes coding for the autoinducer synthases LasI and RhlI was affected by growth temperature, we measured the level of expression by real-time quantitative PCR of these genes and of those already studied using plasmid biosensors (Fig. 5). We corroborated the results obtained in previous experiments with plasmid biosensors, but unexpectedly we also detected considerable thermoregulation of mRNA concentration of *lasI* and to a lesser extent of *rhlI* (Fig. 5).

The higher *lasI* expression at 37 °C (Fig. 5) resulted only in a small increase in 3O-C12-HSL at this temperature (SI Appendix, Fig. S7), as previously mentioned, presumably due to metabolic conditions that modulate the level of LasI substrates. Furthermore, the small increase in 3O-C12-HSL did not have an effect on *lasB* expression (Fig. 5) or elastase production (Fig. 1), but may be the cause of the increase in *rhlI* expression (Fig. 5) and of the increased production of C4-HSL at 37 °C (SI Appendix, Fig. S7). The increase in C4-HSL produced by RhlI potentiates the effect of thermoregulation of RhlR-dependent gene expression.

The thermoregulation of *lasI* might be explained by the presence of an RNA secondary structure that could function as a thermometer in its 5' UTR (Fig. 4 II, A and SI Appendix, Fig. S3B). This putative RNA thermometer contains the characteristic unpaired G in the middle of a predicted RNA stem. However, the unpaired G is not located in the sequence that is complementary to the SD sequence or the initiation codon (Fig. 4 II, A and SI Appendix, Fig. S3B), so we call it a “ROSE-like” element. This element at the 5' UTR of the *lasI* transcript is highly conserved in all of the available *P. aeruginosa* sequenced genomes (SI Appendix, Fig. S4B) (23).

We followed a strategy similar to that described for *rhlA* ROSE-element analysis to determine whether this putative thermometer was functional (Fig. 4). In accordance with our prediction of the presence of an RNA thermometer, we found that the ROSE-like structure in the 5' *lasI* UTR caused thermoregulation of its translation (Fig. 4 II, B), and that a mutation that disrupts the stem of the ROSE-like *lasI* thermometer (C84A) resulted in a considerable increase in expression of the *lasI-lacZ* fusion at both temperatures (Fig. 4 II, C). The increment of expression of the C84A mutant in the *lasI* RNA thermometer was significant at the two temperatures tested (Fig. 4 II, C), showing that this RNA thermometer inhibits *lasI* translation even at 37 °C. Because expression of the constructs containing the *lasI* ROSE-like element was low, it was necessary to use a β -galactosidase activity assay with a fluorescent substrate for its characterization (SI Appendix, Materials and Methods).

To obtain a global picture of the effect of growth temperature on *P. aeruginosa* gene expression, we carried out a transcriptome analysis of cells cultivated in proteose peptone-glucose-ammonium salts (PPGAS) media at 25 °C and 37 °C. We used commercially available genome-wide DNA microarrays (Affymetrix) (SI Appendix, Table S2), and the results obtained were deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO Series accession no. GSE45695. We observed reduced levels of *rhlA*, *rhlB*, and *rhlR* mRNAs in bacteria grown at 25 °C compared with those cultured at 37 °C, but this lower expression was not statistically significant (SI Appendix, Table S3). These results were expected, considering the molecular mechanism involved in their regulation (RNA thermometer) and the low level of sensitivity of microarray analysis. In addition, the microarray data indicated a significant reduction at 25 °C of previously described RhlR-dependent genes (such as the operons encoding for the enzymes involved in pyocyanin synthesis), showing that the effect of thermoregulation of RhlR concentration is biologically significant. We also found in our microarray analysis that *lasI* was markedly thermoregulated (SI Appendix, Table S2).

We find in this work that, in contrast to the complete abrogation of expression of virulence genes by RNA thermometers at 30 °C in other bacterial pathogens (10, 11), *P. aeruginosa* still retains a considerable level of transcription of genes for virulence-associated traits at this temperature (Fig. 1) (12). This pattern of regulation is in agreement with the ability of *P. aeruginosa* to establish pathogenic interactions not only with mammals but also with different hosts including worms (27), flies (28), and even plants (29). Furthermore, our results show that *P. aeruginosa* displays a different strategy to establish pathogenic interactions with warm-blooded animals (with a full induction of QS response) than with other organisms. Therefore, research results of *P. aeruginosa* pathogenicity, or testing of possible therapeutic compounds to treat infections caused by this bacterium that uses insect, plant, or nematode models, might not be able to be extrapolated to clinical situations.

In summary, the results presented here show that the expression of *P. aeruginosa* PAO1 RhlR-dependent virulence-associated traits is considerably diminished at 30 °C due to the reduced expression of *rhlR* from the *rhlA* promoter. This thermoregulation is achieved by a ROSE RNA thermometer present in the *rhlA* 5' UTR that interferes with its translation, and the coupling

of this effect to *rhIB* and *rhIR* expression. This is the first report, to our knowledge, of a functional ROSE element that regulates the expression of virulence-associated genes, and it is also shown, to the authors' knowledge, for the first time that a ROSE element thermoregulates the expression of an entire operon, presumably by means of a polar effect. In addition, we show that a second RNA thermometer in the 5' UTR of *lasI* participates in the thermoregulation of virulence-factor production in *P. aeruginosa*, but the effect on the production of LasR-dependent virulence factors is only marginal. The only significant effect of the increased 3O-C12-HSL caused by the *lasI* RNA thermometer that we detected was the thermoregulation of *rhII* and hence C4-HSL production.

The RNA thermometer that regulates RhIR-dependent virulence production is not exclusive to the PAO1 strain. We determined the presence of this conserved ROSE RNA thermometer in the available *P. aeruginosa* sequenced genomes (*SI Appendix*, Fig. S4) (23). The fact that this RNA thermometer is present in other *P. aeruginosa* strains suggests that it is important for the differential regulation of virulence trait production by *P. aeruginosa* growing in environmental conditions or when establishing infections in warm-blooded hosts.

Unraveling the way *P. aeruginosa* regulates the expression of its virulence-associated traits is of great importance for the development of strategies to control the morbidity and mortality caused by this bacterium. The results presented here contribute to the understanding of this complex phenomenon.

Materials and Methods

A brief description of the materials and methods used is as follows (see *SI Appendix, Materials and Methods* for a more detailed description).

Bacterial Strains, Plasmids, Media, and Growth Conditions. The bacterial strains and plasmid vectors and their derivatives used in this study are summarized

in *SI Appendix, Table S1*. A growth curve in PPGAS medium (30) of the PAO1 strain at 30 °C and 37 °C is shown in *SI Appendix, Fig. S7*.

β -Galactosidase Assays. β -Galactosidase activity was measured either as described by Miller (31) or by using a fluorescent substrate as stated in the text.

DNA Manipulations and Genetic Techniques. DNA manipulations were carried out as previously described (32) and standard genetic techniques were used.

Plasmid Construction. Plasmids used to measure thermoregulation were constructed using a plasmid pBAD18-*lacZ*481-based biosensor (17) as vector using either annealed oligonucleotides or PCR products.

Other Techniques. Standard techniques were used to perform RNA extraction and quantitative real-time PCR; microarray experiments and data analysis; SDS gel electrophoresis and Western blot analysis; determination of *P. aeruginosa* virulence-factor production; acyl-homoserine-lactone extraction; and analytical TLC (*SI Appendix, Materials and Methods*).

Computer Methods. Sequences for computer analysis were retrieved from *Pseudomonas* Genome Database version 2 (www.pseudomonas.com). RNA secondary structures were predicted using mfold version 3.2 (21) and the RNAfold program of the Vienna RNA package (22).

Statistical Analysis. Student *t* test was used to analyze statistical differences between two temperatures. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS. We acknowledge the technical assistance of Marisela Aguirre and Abigail Gonzalez-Valdez. We thank Prof. Franz Narberhaus and Birgit Klinkert for providing plasmid pBAD18-*lacZ*481. This work was partially financed by CONACYT (Grant 50201) and by DGAPA-Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) PAPIIT (Grant IN203613). The work published in this paper represents a substantial part of M.V.G.-B.'s research to obtain her PhD degree in the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM, and she received DGAPA-UNAM PAPIIT, CONACYT, and ICYT-DF scholarships during her studies.

- Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 67(3):351–368.
- 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(2):182–191.
- Latifi A, Fogliano M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21(6):1137–1146.
- Mavrodi DV, et al. (2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 183(21):6454–6465.
- Recinos DA, et al. (2012) Redundant phenazine operons in *Pseudomonas aeruginosa* exhibit environment-dependent expression and differential roles in pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(47):19420–19425.
- Medina G, Juárez K, Díaz R, Soberón-Chávez G (2003) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhIR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 149(Pt 11):3073–3081.
- Croda-García G, Grosso-Becerra V, Gonzalez-Valdez A, Servín-González L, Soberón-Chávez G (2011) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhIR*: Role of the CRP orthologue Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhIR. *Microbiology* 157(9):2545–2555.
- Konkel ME, Tilly K (2000) Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect* 2(2):157–166.
- Johansson J (2009) RNA thermosensors in bacterial pathogens. *Contrib Microbiol* 16: 150–160.
- Böhme K, et al. (2012) Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control *Yersinia* virulence. *PLoS Pathog* 8(2):e1002518.
- Johansson J, et al. (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110(5):551–561.
- Wurtzel O, et al. (2012) The single-nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body temperature. *PLoS Pathog* 8(9):e1002945.
- Morita M, Kanemori M, Yanagi H, Yura T (1999) Heat-induced synthesis of σ^{32} in *Escherichia coli*: Structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure. *J Bacteriol* 181(2):401–410.
- Nocker A, et al. (2001) A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes. *Nucleic Acids Res* 29(23):4800–4807.
- Waldminghaus T, Gaubig LC, Narberhaus F (2007) Genome-wide bioinformatic prediction and experimental evaluation of potential RNA thermometers. *Mol Genet Genomics* 278(5):555–564.
- Kortmann J, Narberhaus F (2012) Bacterial RNA thermometers: Molecular zippers and switches. *Nat Rev Microbiol* 10(4):255–265.
- Waldminghaus T, Fippinger A, Alfsmann J, Narberhaus F (2005) RNA thermometers are common in α - and γ -proteobacteria. *Biol Chem* 386(12):1279–1286.
- Chowdhury S, Maris C, Allain FH-T, Narberhaus F (2006) Molecular basis for temperature sensing by an RNA thermometer. *EMBO J* 25(11):2487–2497.
- Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J (1994) Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176(7):2044–2054.
- Rahim R, et al. (2001) Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 40(3):708–718.
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31(13):3406–3415.
- Hofacker IL (2003) Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res* 31(13): 3429–3431.
- Grosso-Becerra MV, et al. (2014) *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics* 15:318.
- Wenner N, Maes A, Cotado-Sampayo M, Lapouge K (2014) NrsZ: A novel, processed, nitrogen-dependent, small non-coding RNA that regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence. *Environ Microbiol* 16(4):1053–1068.
- Chowdhury S, Ragaz C, Kreuger E, Narberhaus F (2003) Temperature-controlled structural alterations of an RNA thermometer. *J Biol Chem* 278(48):47915–47921.
- Waldminghaus T, Gaubig LC, Klinkert B, Narberhaus F (2009) The *Escherichia coli* *ibpA* thermometer is comprised of stable and unstable structural elements. *RNA Biol* 6(4): 455–463.
- Tan M-W, Ausubel FM (2000) *Caenorhabditis elegans*: A model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 3(1):29–34.
- D'Argenio DA, Gallagher LA, Berg CA, Manoil C (2001) *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol* 183(4):1466–1471.
- Rahme LG, et al. (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(24):13245–13250.
- Zhang Y, Miller RM (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* 58(10): 3276–3282.
- Miller J (1972) *in Experiments in Molecular Genetics* (Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, NY), pp 352–355.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor, NY), 2nd Ed.

SUPPLEMENTARY Information

Detailed description of the materials and methods used:

Bacterial strains, plasmids, media and growth conditions. The bacterial strains and the plasmid vectors and their derivatives used in this study are summarized in Table S1. *E. coli* and *P. aeruginosa* strains were routinely propagated at 37 °C on Luria-Bertani (LB) agar or LB broth (1) and all liquid cultures were grown with shaking (225 rpm). When required, antibiotics were used in selective media at the following concentrations ($\mu\text{g ml}^{-1}$) for *E. coli*: tetracycline (Tc) 30, ampicillin (Am) 200 and chloramphenicol (Cm) 25; for *P. aeruginosa*: carbenicillin (Cb) 200, gentamicin (Gm) 100 and tetracycline 50. For experiments assessing the effect of temperature, PPGAS medium (phosphate-limited-peptone-glucose-ammonium) (2) was inoculated to an OD₆₀₀ of 0.1 with *P. aeruginosa* overnight cultures grown in LB supplemented with the appropriate antibiotics and incubated at 30°C or at 37 °C. For assays of β - galactosidase activity, bacterial cultures were monitored spectrophotometrically by measuring their optical density at 600 nm (OD₆₀₀) at 2 h intervals for 24 h (Fig. S6).

DNA manipulations and genetic techniques. DNA manipulations were carried out as described elsewhere (3). The plasmid DNA was prepared by a Qiaprep miniprep kit (Qiagen). DNA digestion and ligation were performed according to manufacturer's instructions (New England Biolabs). Polymerase chain reactions (PCR) were carried out using high fidelity DNA polymerase (Phusion Hot Start II) as specified by the manufacturer (Thermo Scientific). The PCR products were purified by Qiaquick PCR purification kits or Qiaquick gel extraction kits (Qiagen). DNA sequencing reactions for all constructs were undertaken by the DNA sequencing and oligonucleotide synthesis unit at the Instituto de Biotecnología, UNAM.

The oligonucleotides used are listed in Table S4. Restriction sites were added at the 5' ends of primers to facilitate the cloning of the PCR products. A fragment corresponding to the promoter region of *lecA* (nucleotides -445 to +63) was amplified by PCR using PAO1 genomic DNA as the template and the primers *lecAF/lecAR*. The resulting fragment was cloned into pJET1.2/blunt in accordance with the manufacturer's instructions (Fermentas) and then excised by digestion with *KpnI* and *XhoI*. The 508-bp

product was eluted from an agarose gel after electrophoresis, followed by cloning into the *KpnI* and *XhoI* restriction sites of the promoter-less pLP170 vector (4) to generate a transcriptional fusion to the *lacZ* gene, plasmid pLECA-70. For construction of the pHZA1-20 plasmid, a 1,782 bp fragment from nucleotide +244 of the *phzM* coding region (divergent to *phzA1*), that is equivalent to nucleotide -696 with respect to *phzA1*, to nucleotide +81 relative to the *phzA1* translation start codon was generated by PCR amplification using the primers phzA1EcoRI/phzA1KpnI. This fragment was cloned in pJET1.2/blunt, obtained by digestion and cloned into the *EcoRI* and *KpnI* restriction sites of pMP220 vector (5). The resulting plasmids were introduced into *E. coli* and *P. aeruginosa* strains as described previously (6, 7).

Plasmid construction. The inserts for plasmids pBO-*rhIA*, pBO-*rhIA*(Δ G78) and pBO-*rhIA*(G92A) were constructed by annealing single-stranded oligonucleotides. Briefly, 10 pmol μ l⁻¹ of each of the following pairs of oligonucleotides: *rhIA*-pBADSc/*rhIA*-pBADaSc, *rhIA*-Sc-G78/*rhIA*aSc-G78 or *rhIA*-S-G92A/ *rhIA*-aS-G92A (Table S4) were mixed and heated at 60 °C for 30 min and annealed by slowly cooling down to room temperature. The resulting double stranded oligonucleotide was then ligated into *NheI*-*EcoRI* digested pBAD-18lacZ841 (Table S1). To construct plasmid pBOC-*rhIA* and pBOC*rhIA*(G92A), primers *rhIA*-FL-WT/*rhIA*-RLc-WT and *rhIA*-FL-WT/*rhIA*-RL-G92Ac (Table S4) were used to amplify a fragment of 110 bp corresponding to the complete ROSE-element present in the *rhIA* 5' UTR. PCR products digested with *EcoRI* and *NheI* were cloned into the corresponding sites of pBAD-18lacZ841. Plasmid pBO-*rhIA*,*rhIB* was generated by PCR amplification of a fragment containing the *rhIA* coding region with the small version of the ROSE-element and following an in-frame *lacZ* fusion starting with the AUG codon of *rhIB* using the *rhI*ATSpBAD18/*rhI*B-TRpBAD18 primers (Table S4). To create pBO- Δ *rhIA*,*rhIB*, plasmid pBO-*rhIA*,*rhIB* purified from *E. coli* strain IBEC58 (8) was digested with *MscI* in order to eliminate an internal fragment within the coding region of the *rhIA* gene (+548 to +874). Site-directed mutagenesis to generate plasmid pBOC-*rhIA*(Δ G78) with a deletion of the unpaired G78 was performed using the QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions. Plasmid pBOC-*rhIA* was used as the template and the mutagenesis was done with the primers *rhIA*- Δ G78F/*rhIA*- Δ G78R (Table S4). After verification of the DNA sequences, plasmids were transformed into *E. coli* DH5 α .

Transformants were selected on LB agar plates containing ampicillin (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and X-gal (40 $\mu\text{g ml}^{-1}$) in the presence of 0.04% (w/v) L-arabinose. All β -galactosidase assays for *E. coli* carrying pBAD-18*lacZ*481 *rhIA* fusions were carried out in cells grown to exponential growth phase at 30 °C (OD₆₀₀ 0.5). L-arabinose was added to 0.04% and one sample of 25 ml was maintained at 30 °C. Another sample of equal volume was transferred to 37 °C, and both samples were incubated for 60 min.

To construct plasmid pBOC-*lasI* and pBOC-*lasI*[C84A], primers *lasI*-Ter Fw/*lasI*Ter-Rv and *lasI*-C84A-Fw/*lasI*-C84A-Rv (Table S4) were used, respectively. Cloning into pBAD-18*lacZ*841 and site-directed mutagenesis was undertaken as described above for the *rhIA* ROSE-element. The β -galactosidase activities for *P. aeruginosa* cells carrying the different promoter-probe plasmids (Table S1) were determined spectrophotometrically using *o*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) as the substrate, normalized to the OD₆₀₀ of the bacterial culture and expressed in Miller Units (1).

To determine the effect of growth temperature on the expression of different promoter probe constructs, *E. coli* DH5 α was transformed with the plasmids and grown at 30 °C in LB medium until the exponential phase (optical density of 0.5 at 600 nm). Subsequently, L-arabinose was added to the culture to induce transcription at a concentration of 0.04% (unless in experiments shown in figure S6 where 0.01% was used). Then, half of the culture was maintained at 30 °C (white bars) and the other half was transferred to 37 °C (black bars) for 60 minutes before measuring β -galactosidase activity. The data are expressed as the mean of at least three independent experiments, each performed in duplicate.

β -galactosidase assays for *E. coli* carrying pBAD-18*lacZ*481 *lasI* fusions were performed using Fluorescein di- β D-galactopyranoside (FDG) as substrate. Briefly, 15 ml of LB was inoculated to an OD₆₀₀ of 0.01 with overnight cultures in LB supplemented with the appropriate antibiotics and incubated at 30 °C and 37 °C. The cells were grown to the exponential growth phase (OD₆₀₀ 0.5) and were cooled on ice. β -galactosidase activity was assayed by transferring 20 μl of each culture to the wells of a black 96-well microplate, previously charged with stock solutions of FDG (150 mM in 8:1:1 H₂O/DMSO/ethanol). All measurements were performed in a 200 μl total volume. The samples were incubated at 30 °C and 37 °C for 12 h. Blanks and controls without cells, substrate or inducer were used to eliminate signal background. Fluorescence was

determined with a FL600 fluorescence microplate reader (BioTek Instruments) controlled by an external PC running the data reduction software package Gen5 (BioTek Instruments). Fluorescein production by the hydrolysis of FDG was monitored using a fluorescein filter set (Ex 485±20/Em 528±20) in the plate reader. The sensitivity setting was varied as required and the data were collected from the bottom. All assays were performed in triplicate. The results, normalized to OD₆₀₀, were plotted as relative fluorescence units (RFU) and represent the average of triplicate determinations.

To generate plasmid pBOC-*lasR* (Table S1), oligonucleotides *lasR*-Ter-Fw/ *lasR*-Ter-Rv (Table S4) were used to amplify a fragment of 110 bp of the *lasR* 5' UTR. The PCR product was digested with *EcoRI* and *NheI* and cloned into the corresponding sites into pBAD-18lacZ841. To construct the negative control plasmid pBOC-*gyrA*, consisting of a sequence whose translation is not temperature-dependent (9), the primers *gyrA*EC-FW/*gyrA*EC-Rv (Table S4) were used. β-galactosidase assays for *E. coli* carrying the pBAD-18lacZ481 *gyrA* fusions were carried out as described above for *rhlA* fusions.

RNA extraction and quantitative real-time PCR (qPCR). To perform real-time quantitative PCR (qPCR) analysis, the bacteria were cultured and total RNA was purified as described for transcriptome analysis. For cDNA synthesis, 1 μg of RNA was reverse transcribed using a mix of specific reverse primers (Table S5) and the Revert-Aid H minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Differential expression of the *rhlA*, *rhlR*, *rhlI*, *lasI*, *lasB* and *phzA1* genes was examined by quantitative real-time RT-PCR using a Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions and a Light Cycler 480 II Instrument (Roche). Primer pairs were designed using the Primer3 program (10) and subjected to a BLAST analysis against the *P. aeruginosa* PAO1 genome sequence to eliminate the possibility of nonspecific binding. The cycling conditions used were one cycle of 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s. The data were acquired during the 60 °C annealing step. Each analysis was performed at least three times from three independent cultures. As a reference gene to normalize the results, we used *lasR*, because its expression was very similar at both temperatures tested and its concentration was not affected by

temperature. The quantification technique used to analyze data was the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (11).

Microarray experiments and data analysis. For microarray analysis of mRNA concentration, cells were grown in 15 ml of LB at 37 °C with shaking for 16 h. Overnight cultures were diluted to an OD₆₀₀ of 0.05 in PPGAS medium and grown at 25 °C and 37 °C. Samples were harvested at an OD₆₀₀ of 1.5 (Fig. S5) and the cells from 2.0 ml of each culture were suspended in 0.5 ml of fresh PPGAS media and added to 1.0 ml of RNA Protect bacteria solution (Qiagen). Total RNA was purified using RNAeasy spin columns (Qiagen) according to the manufacturer's instructions, and residual DNA was eliminated by DNase treatment using RNase-free DNaseI (Thermo Scientific). RNA quantity and quality were evaluated by spectrophotometry using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). RNA quality and integrity were confirmed on a denaturing agarose gel and RNA Nano chips in an Agilent Bioanalyzer 2100, respectively. cDNA synthesis, fragmentation, 3'-end labeling and hybridization to Affymetrix GeneChip *P. aeruginosa* genome arrays were carried out by a commercial Affymetrix Genechip service supplier (Affymetrix, Santa Clara, CA). Washing, staining and scanning of the microarrays were performed with the Affymetrix fluidic station. All experiments were performed in triplicate. Data analyses from three biological replicates for each of the conditions were performed after normalizing and summarizing probe level measurements using a Robust Multiarray Average (RMA). Only genes that fit stringent criteria (expression cutoff: 50–100% stringency; p-value ≤ 0.01 of one-way ANOVA data corrected by Benjamini Hochberg FDR; fold-change ≥ 1.4) were selected for further analysis. The microarray data were analyzed using the microarray software package Partek Genomic Suite 6.5 (Partek Inc., St. Louis, MO). The fold change was considered to be significant when the pair PAO1-25 °C versus PAO1-37 °C was at least 1.4-fold or greater up- or down-regulated ($p \leq 0.05$). The list of genes whose expression was significantly altered is shown in Table S2. The microarray data is MIAME compliant and has been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO) and is accessible through GEO Series accession number GSE45695.

SDS gel electrophoresis and western blot analysis. For the preparation of crude cell extracts, cultures were grown in PPGAS medium at 30° C and 37 °C to an OD₆₀₀ of 1.5.

The cells were harvested by centrifugation and re-suspended in PA buffer (10 mM sodium phosphate buffer, 30 mM NaCl, 0.25% Tween-20, 10 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol, pH 7.5) prior to cell disruption through sonication. Cellular debris was removed by centrifugation (13,000 x *g* for 15 min at 4 °C) and the supernatant (containing the soluble protein fraction) was mixed 1:1 v/v with Laemmli loading buffer (12). Total protein concentration was determined using a protein assay kit (Bio-Rad) with bovine serum albumin as the standard. Equal amounts of protein (30 μ g) were separated by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the gels were electro-transferred onto Hybond-C Extra nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences). The membrane was blocked by 5% nonfat milk and incubated with a 1:1000 dilution of the rabbit anti-RhIR, anti-LasR or anti-RhIA polyclonal antibodies.

Goat anti-rabbit immunoglobulin G (Santa Cruz Biotechnology) secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase was used at a 1:10,000 dilution. Detection was performed using the chemiluminescence-based system Super-Signal West Femto (Pierce) followed by exposure to X-ray film (Amersham Biosciences) for autoradiography.

Virulence factors production. Pyocyanin was extracted from culture supernatants and measured as previously described based on its absorbance at 520 nm in acidic solution (13). The pyocyanin assay is based on the absorbance of pyocyanin at 520 nm in acidic solution. A 5 ml sample of culture supernatant was extracted with 3 ml of chloroform and then re-extracted into 1 ml of 0.2 N HCl to give a pink to deep red solution. The absorbance of this solution was measured at 520 nm. Concentrations, expressed as μ g of pyocyanin produced per ml of culture supernatant, were determined by multiplying the optical density at 520 nm (OD_{520}) by a factor of 17.072.

The concentration of rhamnolipids in the sample was determined by the orcinol method (14). A 333 μ l portion of the filtered supernatant was extracted twice with 1 ml of diethyl ether. The diethyl-ether extract was evaporated to dryness and dissolved in 1 ml of deionized water. To 100 μ l of each sample, 900 μ l of a solution containing 0.19% orcinol (in 53% sulfuric acid) was added. The samples were heated at 80 °C in a water-bath for 30 min and cooled for 15 min at room temperature. The A_{421} was measured.

The concentrations of rhamnolipids were determined by comparing the data with a standard curve obtained with L-rhamnose standards between 0 and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

The elastolytic activity of LasB elastase was determined using Elastin Congo Red (ECR) as substrate; the procedure was modified from that described previously (15). Briefly, the cells were grown to an OD_{600} of 1.5 in LB broth at 30 °C and 37 °C and samples of the filter-sterilized supernatants were diluted 1:10 with LB and 1 ml was added to 10 mg of ECR (Sigma) in glass tubes. The mixture was incubated at 37 °C for 16 h with constant shaking (225 rpm). The insoluble substrate was pelleted by centrifugation (13,000 x *g* for 10 min at 4 °C) and the absorbance of the supernatant was measured at 495 nm with a spectrophotometer using an ECR sample incubated with medium alone as the blank. The experiment was performed three times in triplicate with supernatants from three independent cultures. The values from the triplicate experiments were averaged and used as one value to represent each of the three experiments.

N-Acyl-Homoserine Lactone (AHL) extraction and analytical thin-layer chromatography. To evaluate the profiles of AHLs, cells were grown in PPGAS medium at 30 °C and 37 °C for 24 h (Fig. S5). A 10 ml sample of culture supernatant was extracted twice with equal volumes of acidified ethyl acetate and then dried in a fume hood. The residues from the extraction were then dissolved in 100 μl ethyl acetate and a 5 μl sample was analyzed by thin layer chromatography (TLC). Analytical TLC was performed on reverse phase aluminium-backed RP18 F254S TLC plates (20 cm X 20 cm; Merck) (16). The chromatograms were developed with methanol:water (60:40, v:v) and were then air-dried in a fume hood. The TLC plate was then overlaid with a thin film of agar seeded with the AHL reporter strain *Chromobacterium violaceum* CV026 that produces the purple-colored violacein in response to AHLs with N-acyl side chains between 4 and 8 carbons in length (17). After incubation of the plate at 30 °C for 24 h, AHLs were located as purple spots on a white background. Alternatively, TLC plates were overlaid with a thin layer of agar seeded with a culture of an *E. coli* biosensor strain containing the lux-based bioluminescence AHL reporter plasmid (pSB1075). This reporter contains the *P. aeruginosa lasR* gene and the *lasI* promoter fused to *luxCDABE* from *Photobacterium luminescens* and detects 3-oxo-substituted AHL derivatives with acyl chain lengths from 4 to 12 carbons (18). Light emission was

detected using a system for chemiluminescence detection Gel Logic 112 (Kodak). Each experiment was performed at least twice.

Computer methods. Sequences for computer analysis were retrieved from Pseudomonas Genome Database v 2 (<http://www.pseudomonas.com>). RNA secondary structures were predicted using Mfold version 3.2 (19) and the RNA-fold program of the Vienna RNA package (20).

Statistical analysis. Student's t-test was used to analyze statistical differences between samples grown at two different temperatures. A p -value of <0.05 was considered statistically significant.

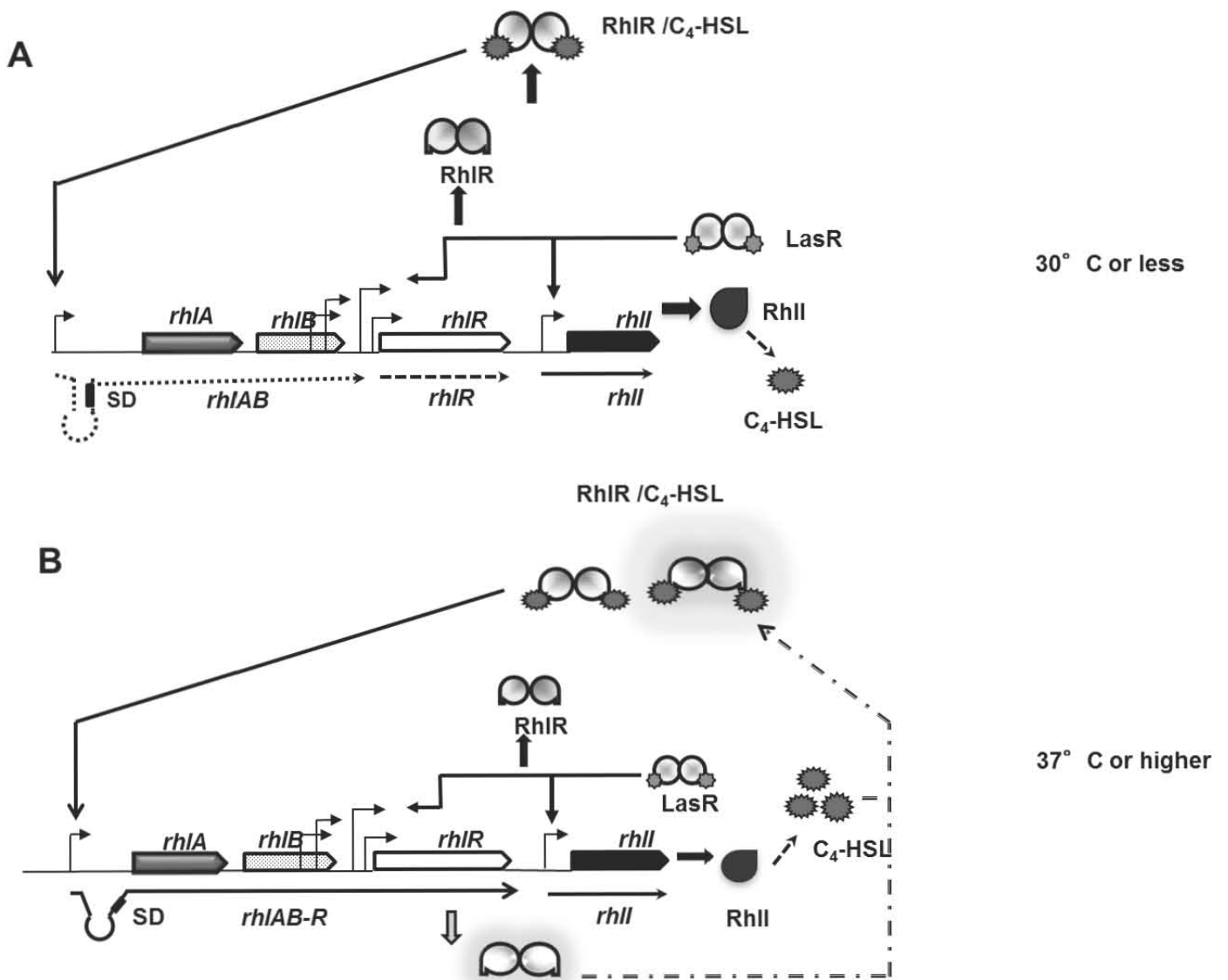


Figure S1. Schematic representation of *rhIR* transcriptional regulation from its five promoters and the role of the ROSE-element at 5' *rhIA* UTR in the autoregulatory loop present at 37 °C. Panel A shows the pattern of expression at 30 °C or lower, where the structure formed by the ROSE-element blocks the *rhIA* Shine-Dalgarno (SD) sequence. Panel B represents the expression of the *rhIAB-R* operon at 37 °C or higher that results in an increased *RhIR* concentration due to the instability of the ROSE-element at this temperature and the exposure of the *rhIA* SD sequence.

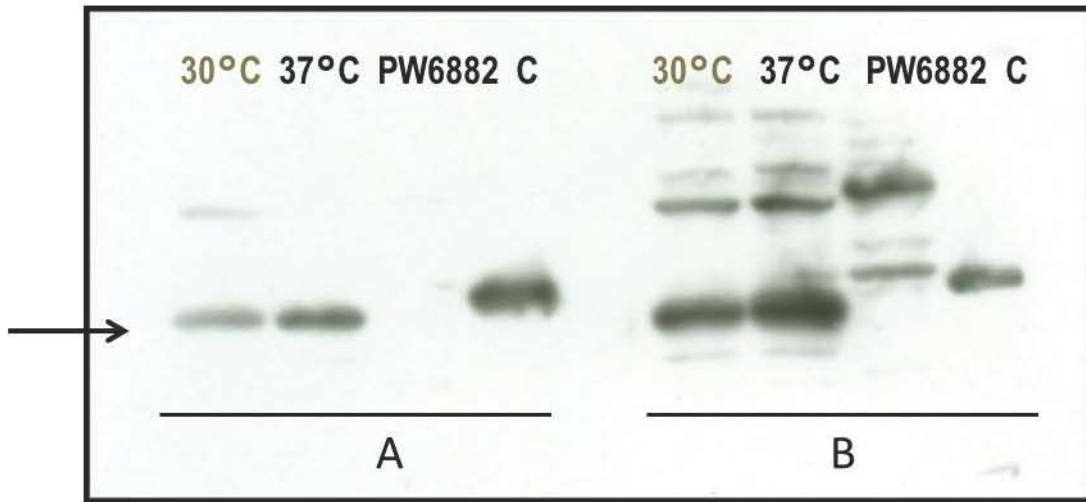


Figure S2. Effect of growth-temperature on RhIA intracellular concentration (30 °C and 37 °C) determined by western blot. RhIA concentration in extracts of PAO1 was determined from cells grown to an OD_{600} of 1.5 in PPGAS medium at 30 °C and 37 °C. Panels A and B correspond to two separate determinations. The same amount of proteins was used in the case negative control [*P. aeruginosa* strain PW6882 which is an *rhIR* mutant]. Positive control (C) [*E. coli* (pET28RhIA)].

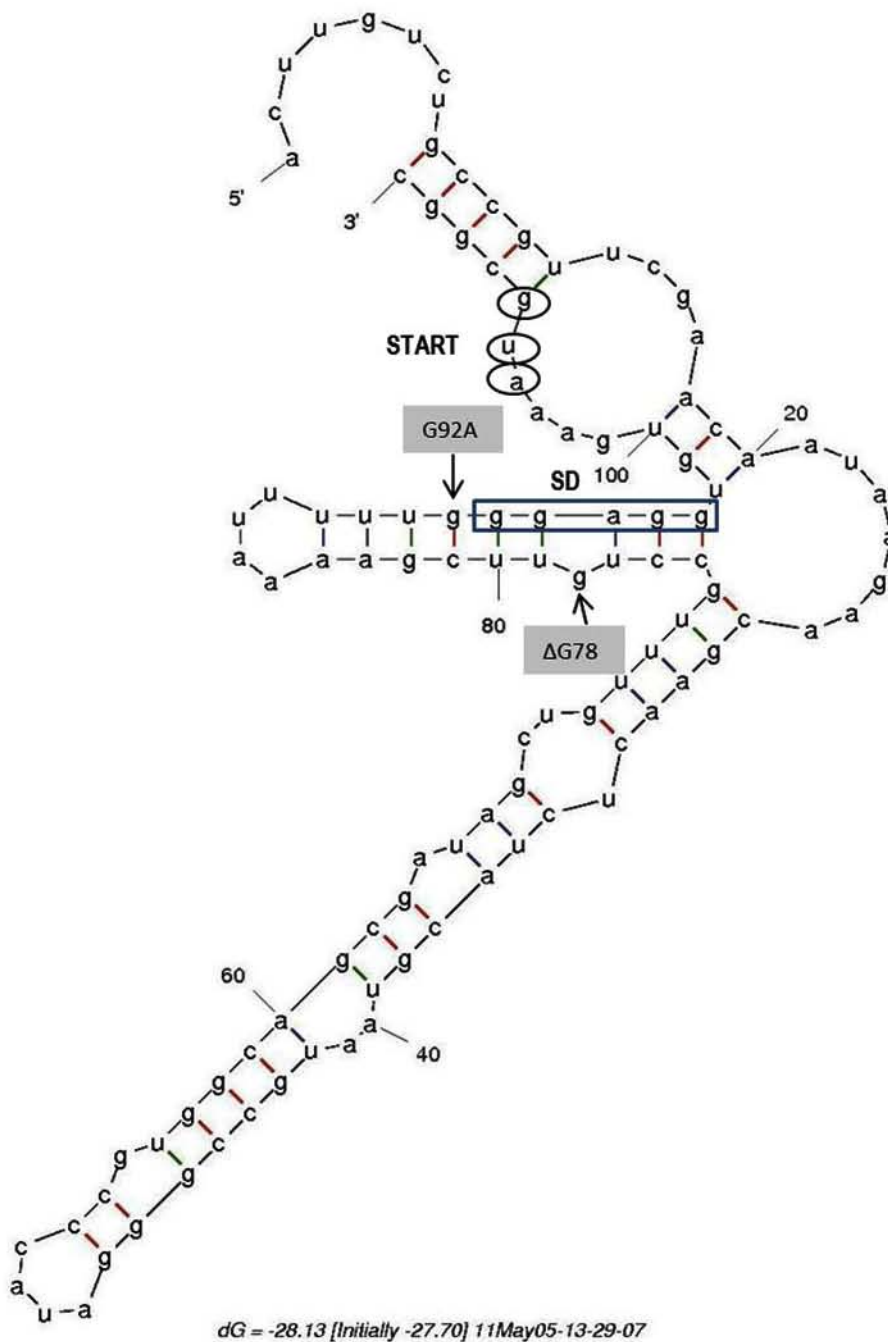
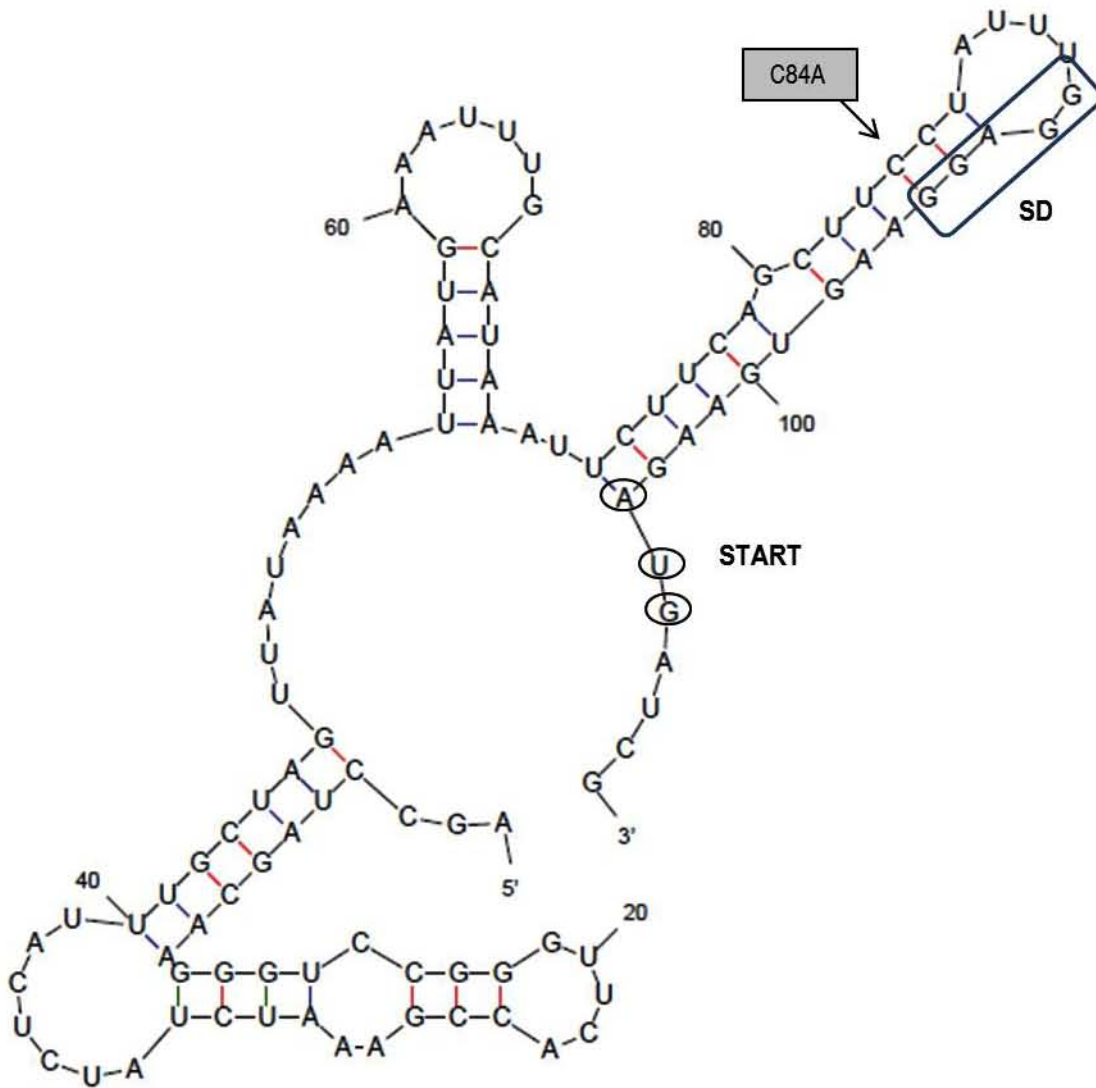


Figure S3A. Secondary structure of the ROSE element present in the 5' UTR of *rhlA*. The Shine-Dalgarno sequence (SD) and the translation start site (START) are shown. Mutations are described in the text.



dG = -27.60 [Initially -27.60] 12Oct04-21-45-41

Figure S3B. Secondary structure of ROSE-like element present in the 5' UTR of *lasI*. The Shine-Dalgarno sequence (SD) and the translation start site (START) are shown. Mutations are described in the text.

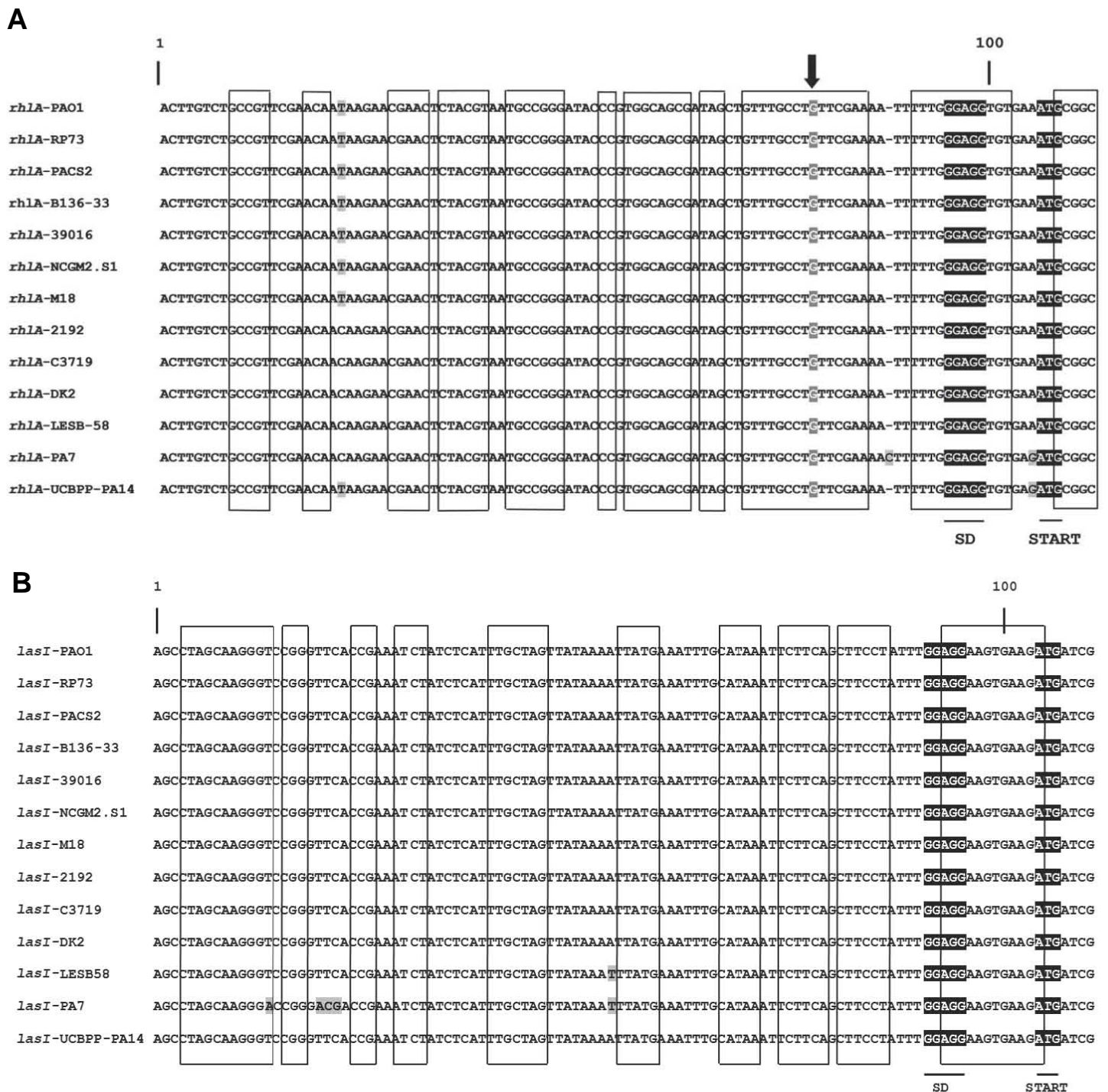


Figure S4. Alignment of the ROSE-like elements presents in the 5' UTR of *rhlA* (A) and *lasI* (B) in *P. aeruginosa* strains. The Shine-Dalgarno sequences (SD) and the translation start sites (START) are indicated. Boxes in the alignment mark regions involved in base pairing in the secondary structure prediction. The conserved G residue opposite to the SD sequence in the 5' UTR of *rhlA* is shaded and indicated by a filled arrow. Non-conserved residues in the alignment are shaded.

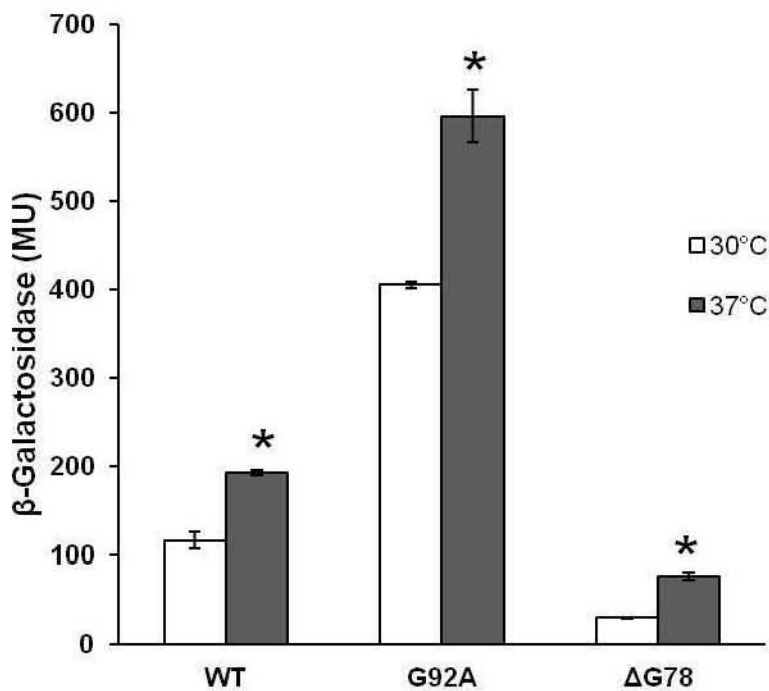


Figure S5. Characterization of the effect of RNA-thermometers present in the 5' UTR of *rhIA* in thermoregulation of gene expression. β -galactosidase activity levels of cells harboring plasmids with different versions of the complete 5'-UTR of *rhIA* fused to *lacZ* (pBOC-*rhIA*). Cells of *E. coli* DH5 α transformed with the corresponding plasmids, were grown at 30 °C in LB until exponential phase (optical density of 0.5 at 600 nm). After addition of 0.04% L-arabinose, half of the culture was maintained at 30 °C (white bars) and the other half was transferred to 37 °C (grey bars) for 60 minutes before measuring β -galactosidase activity. An asterisk (*) indicates a value of $P < 0.05$ by Student's t test.

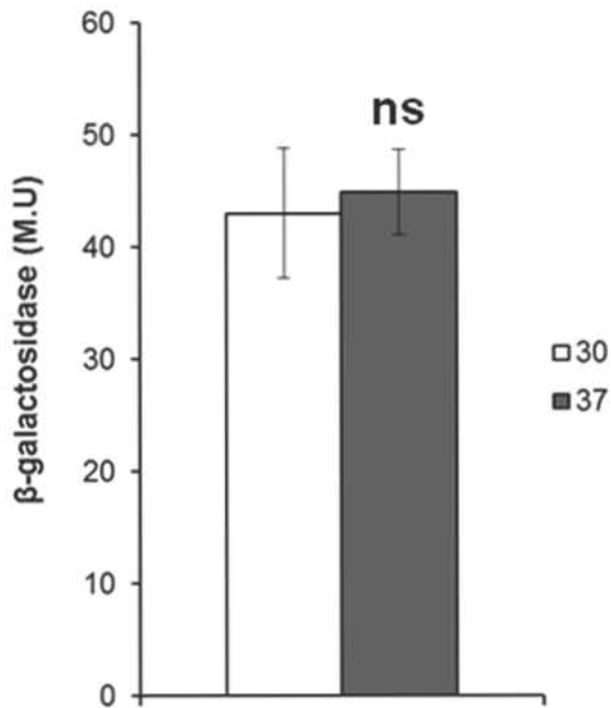


Figure S6. Characterization of the effect of the sequence present in the 5' UTR of *lasR* in thermoregulation of gene expression. β -galactosidase activity levels of cells harboring plasmid pBOC-*lasR*. Cells were grown as described for pBOC-*rhA*, except that L-arabinose addition was 0.01%. An asterisk (*) indicates a value of $P < 0.05$ by Student's t test; ns, means not significant.

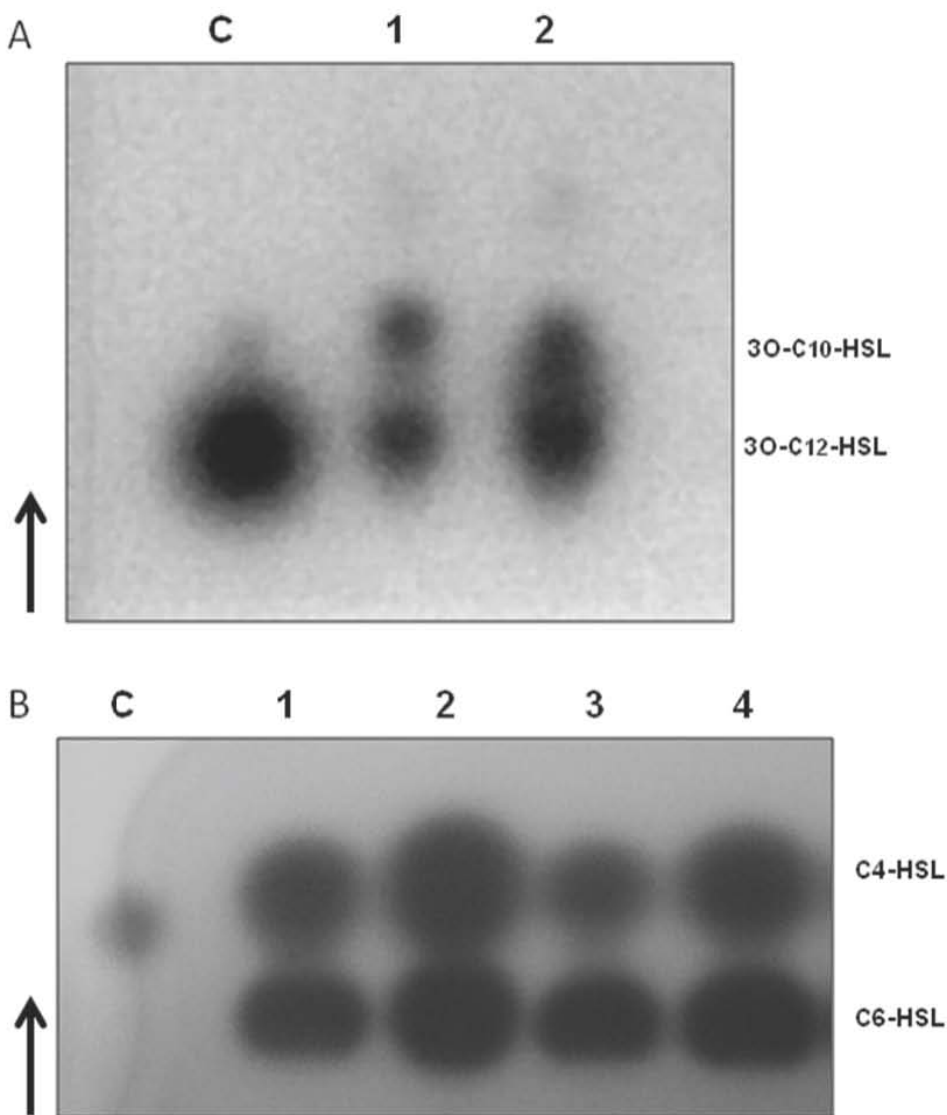


Figure S7. Temperature effect on autoinducers production by *P. aeruginosa* PAO1 and its *rhIR* mutant. In (A), the silica TLC plate was run in 60% methanol for 4 h and overlaid after chromatography with the long-chain AHL biosensor *E. coli* (pSB1075) and in (B) the plate was overlaid after chromatography with the short chain AHL biosensor *C. violaceum* CV026. (A) Lanes: C, positive control 3-oxo-C12-HSL (5 μ l of 10 mM standard); 1 and 2, extracts from cultures in PPGAS at 30°C and 37°C respectively. (B) Lanes: C, positive control C4-HSL (5 μ l of 100 mM standard); 1 and 2, extracts from PAO1 cultures in PPGAS at 30 °C and 37 °C for 24 h, respectively; 3 and 4, extracts from cultures of *rhIR* mutant (PW6882) in PPGAS at 30 °C and 37 °C for 24 h, respectively. Direction of solvent migration is marked with an arrow.

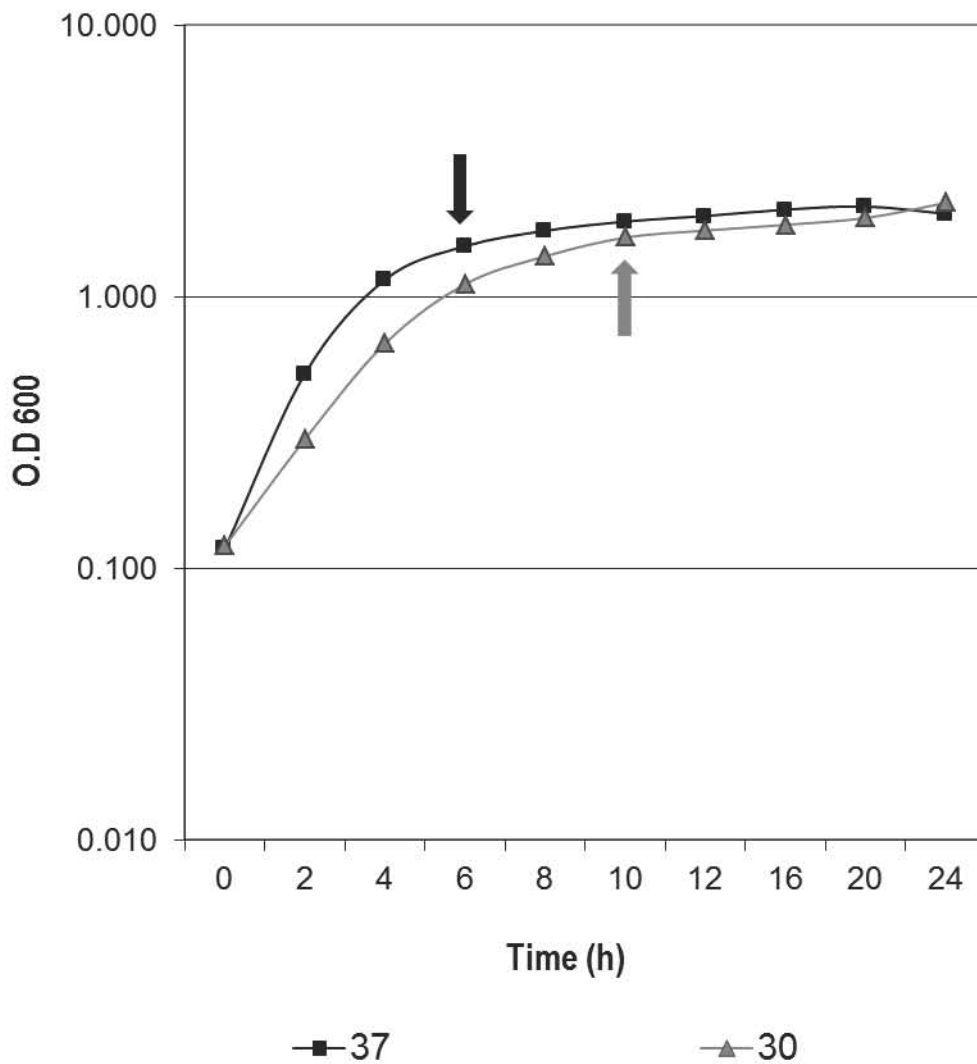


Figure S8. Growth-curve of *P. aeruginosa* PAO1 cultured at 30 °C and 37 °C in PPGAS medium. Arrows show the point where cultures reach an OD₆₀₀ of 1.5.

Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this work.

Bacterial strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference
<i>E. coli</i>		
DH5 α	$\phi 80\Delta lacZ\Delta M15\Delta [lacZYA-argF]JU169 endA recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44$	Invitrogen
IBEC58	<i>gyrA96 relA1 $\Delta dam \Delta dcm \Delta hsdRMS$</i> derivative of BW25113. No DNA methylation	8
<i>C. violaceum</i>		
CV026	Double mini-Tn5 mutant derived from ATCC 31532, Kan ^R , Hg ^R , <i>cvil::Tn5 xyIE, Str^R</i> AHL biosensor, produces violacein pigment only in the presence of exogenous AHL	17
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild type strain of the MPAO1 subline	21
<i>rhIA::Gm</i>	PAO1 derived <i>rhIA</i> : : Ω mutant, Gm ^r	22
PW6882	PAO1 <i>rhIR</i> : : Tn9lacZ mutant	21
PW8143	PAO1 <i>phzA1::ISphoA/hah</i> mutant	21
Plasmids		
pLP170	<i>lacZ</i> transcriptional fusion vector that contains an origin of replication for both <i>P. aeruginosa</i> and <i>E.coli</i> , Ap ^R , Cb ^R	23
pMP220	Broad-host-range, low-copy-number promoter-probe vector; IncP replicon, <i>lacZ</i> Tc ^R Tra-	5
pPCS1002	<i>rhIR</i> promoter region (nt -500 to +242) cloned in pLP170 to create a <i>rhIR</i> '- <i>lacZ</i> transcriptional fusion	23
pLECA-70	<i>lecA</i> promoter region (nt -445 to +63) cloned in pLP170 to create a <i>lecA</i> '- <i>lacZ</i> transcriptional fusion	This study
pHZA1-20	<i>phzM</i> (divergent to <i>phzA1</i>) coding region (nt + 244) and -696 to +81 pb of <i>phzA1</i> gene cloned in pMP220 to create <i>phzA1</i> '- <i>lacZ</i> transcriptional fusion	This study
pMPCG	0.8-kb <i>HindIII-BamHI</i> fragment from plasmid pUO58 containing the <i>rhIAB</i> promoter cloned in pMP220 to create an <i>rhIA</i> '- <i>lacZ</i> transcriptional fusion	24
pUCP20	Expression vector with plac able to replicate in <i>P. aeruginosa</i> and <i>E.coli</i> ; Ap ^R , Cb ^R	25
pGMYC	<i>plac-rhIR</i> cloned on pUCP20	24
pSB1075	<i>lasRlasI'</i> (<i>P. aeruginosa</i> PAO1):: <i>luxCDABE</i> (<i>Photorhabdus luminescens</i> [ATCC 29999]) fusion in pUC18 Amp ^R , AHL biosensor producing bioluminescence	18
pBAD18- <i>lacZ</i> 481	Translational <i>lacZ</i> fusion vector, Apr	26
pBO- <i>rhIA</i>	<i>P. aeruginosa rhIA</i> small ROSE element (nt 74 to 109) fusion in pBAD18 <i>lacZ</i> 481	This study
pBO- <i>rhIA</i> [Δ G78]	<i>P. aeruginosa rhIA</i> Δ G78 ROSE element (nt 74 to 109) fusion in pBAD18 <i>lacZ</i> 481	This study
pBO- <i>rhIA</i> [G92A]	<i>P. aeruginosa rhIA</i> G92A ROSE element (nt 74 to 109) fusion in pBAD18 <i>lacZ</i> 481	This study
pBOC- <i>rhIA</i>	<i>P. aeruginosa rhIA</i> ROSE element (nt 1 to 109) fusion in pBAD18 <i>lacZ</i> 481	This study
pBOC- <i>rhIA</i> [Δ G78]	<i>P. aeruginosa rhIA</i> Δ G78 ROSE element (nt 1 to 109) fusion in pBAD18 <i>lacZ</i> 481	This study
pBOC- <i>rhIA</i> [G92A]	<i>P. aeruginosa rhIA</i> G92A ROSE element (nt 1 to 109) fusion in pBAD18 <i>lacZ</i> 481	This study
pBO- <i>rhIA, rhIB</i>	<i>P. aeruginosa rhIA</i> coding region with small version of the ROSE element cloned in frame with <i>lacZ</i> . Fusion starts with the AUG codon of <i>rhIB</i> in pBAD18 <i>lacZ</i> 481	This study
pBO- Δ <i>rhIA, rhIB</i>	pBO- <i>rhIA, rhIB</i> with a deletion of an internal <i>rhIA</i> fragment (nt +548 to +874)	This study
pBOC- <i>lasI</i>	<i>P. aeruginosa lasI</i> ROSE-like element (nt 1 to 109) fusion in pBAD18 <i>lacZ</i> 481	This study
pBOC- <i>lasI</i> [C84A]	<i>P. aeruginosa lasI</i> C84A ROSE-like element (nt 1 to 109) fusion in pBAD18 <i>lacZ</i> 481	This study
pBOC- <i>gyrA</i>	<i>E. coli gyrA</i> fusion in pBAD18 <i>lacZ</i> 481	9
pBOC- <i>lasR</i>	<i>P. aeruginosa lasR</i> 5' UTR (nt 1 to 110) fusion in pBAD18 <i>lacZ</i> 481	This study

Table S2. Transcripts which were differentially regulated at 25°C and 37°C in PAO1, grown in PPGAS media (>1.4-fold).

ORF	Gene	Gene product ^a	p-value (37 vs. 25)	Fold-Change (37 vs. 25)
PA0672	<i>hemO</i>	heme oxygenase	1.84E-06	1.55
PA4221	<i>fptA</i>	Fe(III)-pyochelin outer membrane receptor precursor	3.46E-06	4.90
PA4225	<i>pchF</i>	pyochelin synthetase	3.84E-06	3.40
PA4222		probable ATP-binding component of ABC transporter	4.33E-06	3.15
PA4224	<i>pchG</i>	pyochelin biosynthetic protein PchG	7.05E-06	4.20
PA3815	<i>iscR</i>	iron-sulfur cluster assembly transcription factor IscR	8.79E-06	2.88
PA4843		probable two-component response regulator	9.34E-06	1.66
PA2588		probable transcriptional regulator	1.03E-05	1.95
PA4223		probable ATP-binding component of ABC transporter	1.32E-05	2.71
PA4156		probable TonB-dependent receptor	1.38E-05	2.45
PA4218	<i>ampP</i>	siderophore transporter	1.70E-05	3.50
PA4220		hypothetical protein	1.88E-05	4.40
PA3572		hypothetical protein	2.20E-05	-1.56
PA0614		hypothetical protein	2.57E-05	-1.61
PA2483		conserved hypothetical protein	3.98E-05	1.50
PA1911	<i>femR</i>	sigma factor regulator, FemR	4.18E-05	1.41
PA0044	<i>exoT</i>	exoenzyme T	4.27E-05	1.55
PA1300		probable sigma-70 factor, ECF subfamily	5.62E-05	1.84
PA4726	<i>cbrB</i>	two-component response regulator CbrB	7.75E-05	1.42
PA4226	<i>pchE</i>	dihydroaeruginosic acid synthetase	8.79E-05	3.33
PA3009		hypothetical protein	9.70E-05	1.47
PA1912	<i>femI</i>	ECF sigma factor, FemI	1.06E-04	1.73
PA1711	<i>exsE</i>	hypothetical protein	1.21E-04	1.57
PA1151	<i>imm2</i>	pyocin S2 immunity protein	1.43E-04	1.83
PA3530	<i>bfd</i>	conserved hypothetical protein	1.46E-04	1.62

Table S2. Cont.

ORF	Gene	Gene product ^a	p-value (37 vs. 25)	Fold-Change (37 vs. 25)
PA4219	<i>ampO</i>	hypothetical protein	1.46E-04	1.65
PA3813	<i>iscU</i>	probable iron-binding protein IscU	1.59E-04	2.06
PA2030		hypothetical protein	1.59E-04	2.01
PA5531	<i>tonB</i>	TonB protein	1.61E-04	2.34
PA0471		conserved hypothetical protein	1.65E-04	1.50
PA4896		probable sigma-70 factor, ECF subfamily	1.89E-04	1.45
PA0665		conserved hypothetical protein	2.57E-04	2.49
PA4217	<i>phzS</i>	flavin-containing monooxygenase	2.81E-04	3.59
PA1847	<i>nfuA</i>	hypothetical protein	3.31E-04	2.56
PA0810		probable haloacid dehalogenase	3.54E-04	-1.44
PA3814	<i>iscS</i>	L-cysteine desulfurase (pyridoxal phosphate-dependent)	3.73E-04	1.79
PA4231	<i>pchA</i>	salicylate biosynthesis isochorismate synthase	4.06E-04	3.24
PA0270		hypothetical protein	4.70E-04	1.53
PA0941		hypothetical protein	4.77E-04	1.40
PA1432	<i>lasI</i>	autoinducer synthesis protein LasI	5.26E-04	2.62
PA3662		hypothetical protein	5.65E-04	1.96
PA5346	<i>sadB</i>	Predicted signal transduction protein	6.19E-04	1.75
PA3600		conserved hypothetical protein	6.29E-04	1.70
PA1169		probable lipoxygenase	6.95E-04	-1.54
PA4142	<i>rpmJ</i>	50S ribosomal protein L36	7.64E-04	1.65
PA4324		hypothetical protein	9.08E-04	1.85
PA1708	<i>popB</i>	translocator protein PopB	9.53E-04	2.01
PA3617	<i>recA</i>	RecA protein	9.78E-04	1.42
PA3529		alkylhydroperoxide reductase C	1.05E-03	3.23
PA0436		probable transcriptional regulator	1.05E-03	1.51
PA2034		hypothetical protein	1.06E-03	1.86

Table S2. Cont.

ORF	Gene	Gene product ^a	p-value (37 vs. 25)	Fold-Change (37 vs. 25)
PA5481		hypothetical protein	1.10E-03	-5.16
PA3972		probable acyl-CoA dehydrogenase	1.17E-03	1.90
PA3183	<i>zwf</i>	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	1.21E-03	1.50
PA3601		conserved hypothetical protein	1.42E-03	3.96
PA0505		hypothetical protein	1.58E-03	1.83
PA5499	<i>np20</i>	transcriptional regulator np20	1.61E-03	1.59
PA4230	<i>pchB</i>	salicylate biosynthesis protein PchB	1.63E-03	3.62
PA0269		conserved hypothetical protein	1.66E-03	2.07
PA5276	<i>lppL</i>	Lipopeptide LppL precursor	1.72E-03	1.42
PA2401	<i>pvdJ</i>	Non-ribosomal peptide synthetase	1.80E-03	1.69
PA4570		hypothetical protein	1.91E-03	2.08
PA4525	<i>pilA</i>	type 4 fimbrial precursor PilA	2.38E-03	2.14
PA4470	<i>fumC1</i>	fumarate hydratase	2.40E-03	2.23
PA1905	<i>phzG2</i>	probable pyridoxamine 5'-phosphate oxidase	2.59E-03	3.00
PA4141		hypothetical protein	2.63E-03	3.06
PA3841	<i>exoS</i>	exoenzyme S	2.77E-03	1.53
PA4251	<i>rplE</i>	50S ribosomal protein L5	2.86E-03	1.66
PA0336	<i>ygdP</i>	Nudix hydrolase YgdP	2.96E-03	1.52
PA2031		hypothetical protein	3.33E-03	2.12
PA0050		hypothetical protein	3.52E-03	-1.53
PA0200		hypothetical protein	3.71E-03	-2.35
PA5339		conserved hypothetical protein	3.90E-03	1.55
PA3441		probable molybdopterin-binding protein	3.97E-03	1.61
PA3973		probable transcriptional regulator	4.09E-03	2.53
PA1168		hypothetical protein	4.19E-03	-2.82
PA0456		probable cold-shock protein	4.47E-03	1.85

Table S2. Cont.

ORF	Gene	Gene product ^a	p-value (37 vs. 25)	Fold-Change (37 vs. 25)
PA2575		hypothetical protein	4.54E-03	1.67
PA3182	<i>pgl</i>	6-phosphogluconolactonase	4.62E-03	1.75
PA4155		hypothetical protein	4.88E-03	1.92
PA2400	<i>pvdJ</i>	Non-ribosomal peptide synthetase	5.10E-03	2.02
PA1747		hypothetical protein	5.19E-03	1.40
PA1749		hypothetical protein	5.74E-03	1.43
PA2742	<i>rpmI</i>	50S ribosomal protein L35	5.86E-03	1.52
PA3014	<i>faoA</i>	fatty-acid oxidation complex alpha-subunit	6.81E-03	-1.44
PA0263	<i>hcpA</i>	secreted protein Hcp	7.19E-03	-2.25
PA0872t	<i>phhA</i>	phenylalanine-4-hydroxylase	7.26E-03	2.62
PA5170	<i>arcD</i>	arginine/ornithine antiporter	7.26E-03	-2.09
PA2009	<i>hmgA</i>	homogentisate 1,2-dioxygenase	7.39E-03	1.58
PA4615		probable oxidoreductase	7.45E-03	1.67
PA0870	<i>phhC</i>	aromatic amino acid aminotransferase	8.06E-03	1.48
PA3880		conserved hypothetical protein	8.24E-03	-1.69
PA0296	<i>spul</i>	Glutamylpolyamine synthetase	8.39E-03	1.45
PA4209	<i>phzM</i>	probable phenazine-specific methyltransferase	8.95E-03	1.47
PA2411		probable thioesterase	9.06E-03	1.74
PA5429	<i>aspA</i>	aspartate ammonia-lyase	9.26E-03	1.46
PA1677		conserved hypothetical protein	9.30E-03	1.62
PA3812	<i>iscA</i>	probable iron-binding protein IscA	9.54E-03	1.83
PA2033		hypothetical protein	1.01E-02	2.07
PA1148	<i>toxA</i>	exotoxin A precursor	1.04E-02	-1.45
PA2399	<i>pvdD</i>	pyoverdine synthetase D	1.06E-02	1.77
PA4229	<i>pchC</i>	pyochelin biosynthetic protein PchC	1.08E-02	2.26
PA1802	<i>clpX</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	1.11E-02	1.64

Table S2. Cont.

ORF	Gene	Gene product ^a	p-value (37 vs. 25)	Fold-Change (37 vs. 25)
PA4471	<i>lldD</i>	L-lactate dehydrogenase	1.12E-02	2.27
PA3361	<i>lecB</i>	fucose-binding lectin PA-III	1.12E-02	2.20
PA2405		hypothetical protein	1.13E-02	1.52
PA2402		probable non-ribosomal peptide synthetase	1.14E-02	1.92
PA3181		2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase	1.15E-02	1.47
PA3195	<i>gapA</i>	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	1.20E-02	1.79
PA4250	<i>rpsN</i>	30S ribosomal protein S14	1.27E-02	1.57
PA2412		conserved hypothetical protein	1.31E-02	2.21
PA2377		hypothetical protein	1.40E-02	-2.91
PA4254	<i>rpsQ</i>	30S ribosomal protein S17	1.49E-02	1.60
PA1244		hypothetical protein	1.56E-02	2.08
PA2015	<i>gnyD</i>	Citronelloyl-CoA dehydrogenase, GnyD	1.58E-02	1.45
PA4139		hypothetical protein	1.61E-02	-2.53
PA2880		hypothetical protein	1.61E-02	1.63
PA1914		conserved hypothetical protein	1.61E-02	-2.32
PA1895		hypothetical protein	1.68E-02	-1.56
PA2427		hypothetical protein	1.68E-02	1.75
PA1875		probable outer membrane protein precursor	1.71E-02	-1.44
PA4264	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	1.77E-02	1.50
PA4253	<i>rplN</i>	50S ribosomal protein L14	1.77E-02	1.47
PA4751	<i>ftsH</i>	cell division protein FtsH	1.78E-02	1.45
PA2743	<i>infC</i>	translation initiation factor IF-3	1.79E-02	1.71
PA0713		hypothetical protein	1.80E-02	1.84
PA5100	<i>hutU</i>	urocanase	1.82E-02	1.60
PA2016	<i>gnyR</i>	Regulatory gene of gnyRDBHAL cluster, GnyR	1.85E-02	1.83
PA3407	<i>hasAp</i>	heme acquisition protein HasAp	1.86E-02	1.54

Table S2. Cont.

ORF	Gene	Gene product ^a	p-value (37 vs. 25)	Fold-Change (37 vs. 25)
PA4917		hypothetical protein	2.32E-02	1.44
PA2604		conserved hypothetical protein	2.31E-02	1.56
PA1431	<i>rsaL</i>	regulatory protein RsaL	2.42E-02	1.74
PA1793	<i>ppiB</i>	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	2.45E-02	1.41
PA2501		hypothetical protein	2.61E-02	1.53
PA4228	<i>pchD</i>	pyochelin biosynthesis protein PchD	2.65E-02	1.83
PA3049	<i>rmf</i>	ribosome modulation factor	2.69E-02	1.90
PA3385	<i>tpbA</i>	protein tyrosine phosphatase TpbA	2.77E-02	1.90
PA4130		probable sulfite or nitrite reductase	2.87E-02	1.55
PA5018	<i>msrA</i>	peptide methionine sulfoxide reductase	3.03E-02	1.47
PA5351	<i>rubA1</i>	Rubredoxin 1	3.36E-02	-1.71
PA0423	<i>pasP</i>	Uncharacterized conserved protein	3.37E-02	1.42
PA4467		hypothetical protein	3.41E-02	1.41
PA0980		hypothetical protein	3.63E-02	-1.53
PA2404		hypothetical protein	1.30E-02	1.44

^a The genes regulated by QS are shown in boldface.

Table S3. Transcripts of RhIR regulon which were differentially regulated at 25°C and 37°C in PAO1, grown in PPGAS media (>1.4-fold).

ORF	Gene	Gene	p-value (37 vs. 25)	Fold-Change (37 vs. 25)
PA3479	<i>rhIA</i>	rhamnosyltransferase chain A	0.274746	1.49
PA3477	<i>rhIR</i>	transcriptional regulator RhIR	0.116055	1.36
PA3478	<i>rhIB</i>	rhamnosyltransferase chain B	0.12511	1.72

Table S4. Oligonucleotides used in this study.

Name	Oligonucleotide sequence 5'→3' [plasmid constructed] ^{a,b}
lecAF	ACCC GGTACCG TTTCGACCC [pLECA70]
lecAR	TAAAATCC CTCGAC GGTAACCCCG [pLECA70]
phzA1 EcoRI	GTGGGG GAATTC GCGTAGCCGTCGCGGG [pHZA1-20]
phzA1 KpnI	CATTGCCA GGTACCG TCCACCGTGGCG [pHZA1-20]
rhIA-pBADSc	CTAGCCT GTTCGAAAATTTTGGGAGGTGTGAAATGCGGG [pBO- <i>rhIA</i>]
rhIA-pBADaSc	AATTC CCGCATTTTACACCTCCCAAAAATTTTCGAACAGG [pBO- <i>rhIA</i>]
rhIA-Sc-G78	CTAGCCT TTTCGAAAATTTTGGGAGGTGTGAAATGCGGG [pBO- <i>rhIA</i> (ΔG78)]
rhIA-aSc-G78	AATTC CCGCATTTTACACCTCCCAAAAATTTTCGAAAGG [pBO- <i>rhIA</i> (ΔG78)]
rhIA-S-G92A	CTAGCCT GTTCGAAAATTTTAGGAGGTGTGAAATGCGGG [pBO- <i>rhIA</i> (G92A)]
rhIA-aS-G92A	AATTC CCGCATTTTACACCTCCTAAAAATTTTCGAACAGG [pBO- <i>rhIA</i> (G92A)]
rhIA-FL-WT	GATGGCC GGCTAGCT ACTTGTCTGCCGT [pBOC- <i>rhIA</i> and pBOC- <i>rhIA</i> (G92A)]
rhIA-RLc-WT	CCAACAGACT GAATTC CCGCATTTTACACCTCC [pBOC- <i>rhIA</i>]
rhIA-RL-G92Ac	CT GAATTC CCGCATTTTACACCTCCTAAAAATTTTCGAACAGG [pBOC- <i>rhIA</i> (G92A)]
rhIA- TS pBAD18	GCAGCGATAGCT GCTAGCCT GTTCG [pBO- <i>rhIA</i> , <i>rhIB</i>]
rhIB-TR pBAD18	CGATGAG GAATTC GTGCATGGGGCT [pBO- <i>rhIA</i> , <i>rhIB</i>]
rhIA-ΔG78F	GCGATAGCTGTTTGCCT G TTTCGAAAATTTTGGGAG [deletion of G78 in pBOC- <i>rhIA</i>]
rhIA-ΔG78R	CTCCCAAAAATTTTCGA A CAGGCAACAGCTATCGC [deletion of G78 in pBOC- <i>rhIA</i>]
lasI-Ter-Fw	CGGACGTTTCT GCTAGCCT AG [pBO- <i>lasI</i>]
lasI-Ter-Rv	GCCGACCAAT GAATTC GATCATC [pBO- <i>lasI</i>]

lasI-C84A-Fw	AATTTGCATAAAATTCTTCAGCTT <u>A</u> CTATTTGGAGGAAGTGAAGATGA [pBOC- <i>lasI</i> (C84A)]
lasI-C84A-Rv	TCATCTTCACTTCCTCCAAATAG <u>T</u> AAGCTGAAGAATTTATGCAAATT [pBOC- <i>lasI</i> (C84A)]
gyrAEC-FW	CTAGCGGG GATACAGTAGAGGGATAGCGGTTAGATGAGCG [pBOC- <i>gyrA</i>]
gyrAEC-Rv	AATTCGCT CATCTAACCGCTATCCCTCTACTGTATCCCG [pBOC- <i>gyrA</i>]
lasR -Ter-Fw	CGCATGG CTAGCGGC AGG [pBOC- <i>lasR</i>]
lasR-Ter-Rv	CCGTC GAATTCGGCC ATAGCG [pBOC- <i>lasR</i>]

^a Introduced restriction sites are in boldface.

^b Nucleotides mutated and exchanged in the oligonucleotides are underlined and shaded.

Table S5. Primers used for qRT-PCR.

Amplicon	Primer	Sequence 5'→3'	Position ^a	Length
<i>rhIA</i>	rt_rhIA-F	AACATTTCAACGTGGTGCTG	155	100
	rt_rhIA-R	ATTTCCACCTCGTCGTCCTT	254	
<i>rhIR</i>	rt_rhIR-F2	CTGGGCTTCGATTACTACGC	112	124
	rt_rhIR-R2	CCCGTAGTTCTGCATCTGGT	215	
<i>rhII</i>	rt_rhII-F	GGAGCGCTATTTTCGTTTCG	429	100
	rt_rhII-R	GTAGGCCCGGAAGCTGAT	528	
<i>lasR</i>	rt_lasR-F	CGGTTTTCTTGAGCTGGAAC	15	100
	rt_lasR-F	GCCGAACAGGATCTTCGAG	114	
<i>lasI</i>	rt_lasI-F	GGCTGGGACGTTAGTGTCAT	94	100
	rt_lasI-F	CCTGGGCTTCAGGAGTATCTT	193	
<i>lasB</i>	rt_lasB-F	AACCGTGCGTTCTACCTGTT	1279	100
	rt_lasB-F	TGGTGGCGGTCCAGTAGTA	1378	
<i>phzA1</i>	rt_phzA1-F	AACCACTACATCCATTCCTTCG	355	100
	rt_phzA1-R	CGGCTATTCCCAATGCAC	454	

^a Position in the coding-region

References

1. Miller J (1972) in *Experiments in Molecular Genetics*, Published by Cold Spring Harbor Laboratory (Cold Spring Harbor Laboratory, NY) pp 352-355.
2. Zhang Y, Miller RM (1992) Enhanced Octadecane dispersion and biodegradation by *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (Biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* 58(10): 3276-3282.
3. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
4. Preston MJ, Seed PC, Toder DS, Iglewski BH, Ohman DE et al. (1997) Contribution of proteases and LasR to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infections. *Infect Immun* 65(8): 3086-3090.
5. Spaink HP, Okker RJH, Wijffelman C A, Pees E, Lugtenberg B (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI . *Plant Mol Biol* 9(1): 27-39.
6. Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(7): 2172-2175.
7. Irani VR, Rowe JJ (1997) Enhancement of transformation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Mg⁺² and heat. *Biotechniques* 22(1): 54-56.
8. González-Cerón G, Miranda-Olivares OJ, Servín-González L (2009) Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and the role played by lateral acquired genes. *FEMS Microbiol Lett* 301(1): 35-43.
9. Waldminghaus T, Gaubig LC, Narberhaus F (2007) Genome-wide bioinformatic prediction and experimental evaluation of potential RNA thermometers. *Mol Genet Genomics* 278(5): 555-564.
10. Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols*:

Methods in Molecular Biology Vol. 132, eds Krawetz S, Misener S (Humana Press Humana Totowa, NJ).

11. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25(4): 402-408.
12. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
13. Medina G, Juarez K, Valderrama B, Soberon-Chavez G (2003) Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J Bacteriol* 185(20): 5976-5983.
14. Essar DW, Eberly L, Crawford IP (1990) Evolutionary differences in chromosome locations of four early genes of the tryptophan pathway in fluorescent pseudomonads: DNA sequences and characterization of *Pseudomonas putida trpE* and *trpGDC*. *J Bacteriol* 172(2): 867-883.
15. Chandrasekaran EV, Bemiller JN (1980) Constituent analyses of glycosaminoglycans. In *Methods in carbohydrate chemistry*, editor Whistler RL (Academic Press, New York) pp 89–96.
16. Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL, Levesque RC, Mattick JS (2002) Differential Regulation of Twitching Motility and Elastase Production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184(13): 3605-3613.
17. Middleton B, Rodgers HC, Cámara M, Knox AJ, Williams P et al. (2002) Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. *FEMS Microbiol Lett* 207(1): 1-7.
18. Shaw PD, Ping G, Daly SL, Cha C, Cronan JE Jr. et al. (1997) Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(12): 6036-6041.
19. Winson MK, Swift S, Fish L, Throup JP, Jorgensen F et al. (1998) Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett* 163(2): 185–92.
20. Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31(13): 3406-3415.

21. Hofacker IL (2003) Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res* 31(13): 3429-3431.
22. Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E et al. (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(24): 14339-14344.
23. Rahim R, Ochsner U, Olvera C, Graninger M, Messner P et al. (2001) Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhIC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 40(3): 708-718.
24. Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH (1997) Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179(10):3127-31321.
25. Medina G, Juárez K, Díaz, R, Soberón-Chávez G (2003) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhIR* encoding a quorum sensing regulatory protein. *Microbiology* 149(Pt11): 3073-3081.
26. West SEH, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janeck LJ (1994) Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148(1): 81-86.
27. Waldminghaus T, Fippinger A, Alfsmann J, Narberhaus F (2005) RNA thermometers are common in α - and γ -proteobacteria. *Biol Chem* 386(12): 1279-1286.

RNA structures are involved in the thermoregulation of bacterial virulence-associated traits

María Victoria Grosso-Becera, Luis Servín-González, and Gloria Soberón-Chávez

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones, Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Tercer Circuito Escolar, Apartado Postal 70228, DF, México

Pathogenic bacteria are exposed to temperature changes during colonization of the human body and during exposure to environmental conditions. Virulence-associated traits are mainly expressed by pathogenic bacteria at 37°C. We review different cases of post-transcriptional regulation of virulence-associated proteins through RNA structures (called RNA thermometers or RNATs) that modulate the translation of mRNAs. The analysis of RNATs in pathogenic bacteria has started to produce a comprehensive picture of the structures involved, and of the genes regulated by this mechanism. However, we are still not able to predict the functionality of putative RNATs predicted by bioinformatics methods, and there is not a global approach to measure the effect of these RNA structures in gene regulation during bacterial infections.

RNA structures that sense temperature changes in pathogenic bacteria

There is a wide range of strategies among pathogenic bacteria to establish infections and different bacterial species produce diverse virulence associated traits, such as toxins, adhesins, and immunomodulators [1–4]; these interactions can occur with opportunistic pathogens as well as with obligate commensals or pathogens. Sometimes all the members of a bacterial genus or species are pathogenic (e.g., *Shigella*, *Listeria* and *Pseudomonas aeruginosa* [5–12]), while in other genera only certain subgroups have the genetic information necessary to establish pathogenic interactions. In many of these cases, this information is encoded in mobile genetic elements such as plasmids, phages, or pathogenicity islands (such as with *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* [13–20]). Some bacteria infect specific organs or tissues, while others have the ability to produce systemic infections [21–26]. It is therefore not feasible to make generalizations about the mechanisms involved in the genetic regulation of genes coding for virulence-associated traits in different bacterial pathogens. However, a common feature of all bacterial pathogens is that they are subject to shifts in temperature during their life cycle, experiencing environmental temperatures

of 30°C or less, and the human body temperature of 37°C, which can even increase to 42°C during infection [27–34]. Therefore, the production of virulence-associated traits in all cases has to be coupled with the exposure to a temperature of 37°C or higher, and at least in the case of *Neisseria meningitidis* [32] to 42°C, as will be discussed further. Thus, bacterial pathogens respond to temperature changes throughout their life cycles and sense structural changes of protein, RNA, and even DNA [35–40].

A molecular mechanism that couples protein production with bacterial exposure to body temperature in pathogenic bacteria is the presence of RNA structures that block ribosome binding sites (RBSs) of mRNAs at different levels depending on the environmental temperature [41]. These structures are called RNATs, and here we review how they participate in the regulation of expression of virulence-related traits in bacteria and establish some of the research challenges in this field (Box 1).

What is an RNAT?

RNATs are zipper-like structures present in the 5' untranslated regions (UTRs) of some mRNAs that mask the RBS. As temperature increases, the structure gradually melts, partially exposing the RBS, so that translation of the protein encoded by the mRNAs containing these sequences gradually increases. These RNA structures are sensitive to temperature changes, to the extent that they have been reported to detect variations on the scale of 1°C (Table 1) [42]. However, it is not completely understood how RNATs detect and respond to subtle changes in temperature [41,43]. This graded response differs to the on-off response of riboswitches (Table 1) [44,45] that are also RNA structures present in 5' UTR of some mRNAs. Riboswitches activate translation assuming an open conformation when binding certain metabolites such as S-adenosine-methionine (SAM) or several vitamins [46–48]. In the case of riboswitches responding to SAM, the RNA structure that binds this metabolite is cleaved from the mRNA and becomes a *trans*-acting riboswitch, regulating the expression of other genes, similar to the mechanism of small noncoding RNA (sncRNA) [49–51]. In the case of *Listeria monocytogenes*, the regulation of the expression of virulence-related traits through the transcriptional activator PrfA, and both an RNAT and a *trans*-acting SAM-dependent riboswitch participate [52], as will be described further.

Corresponding author: Soberón-Chávez, G. (gloria@biomedicas.unam.mx).

Keywords: thermoregulation; bacterial virulence; RNA thermometers.

0966-842X/

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2015.04.004>

Table 1. Characteristics of RNA structures that function as riboswitches [44–48] and as RNATs [41–43,54]

Riboswitches	RNATs
Regulate the translation of proteins by blocking the binding of ribosomes to the SD sequence, when acquiring the off position.	Regulate the translation of proteins by blocking the binding of ribosomes to the SD sequence at low temperatures.
Interact with small molecules, such as vitamins or SAM; have two mutually exclusive conformations (on and off), depending on their interaction with ligands.	Do not interact with ligands.
There is only one case that has been reported in which a riboswitch responds to temperature. This is the case of the <i>cIII</i> mRNA in which two mutually exclusive structures function like a switch that blocks the RBS at high temperature [53].	Gradually change their structure as temperature rise, exposing the SD sequence at higher temperatures.
Possess conserved sequences, corresponding to the site of interaction with ligands.	Do not have any sequence conservation.
These structures are present in the 5' UTR of mRNA, but in some cases they are cleaved and regulate gene expression <i>in trans</i> .	These structures are present in the 5' UTR of mRNA and can only function <i>in cis</i> .

Riboswitches can also participate in thermoregulation of genes, as in the case of the phage λ *cIII* protein that participates in the lysis–lysogeny phage strategy. Phages can take one of two pathways when infecting bacteria; they can produce hundreds of copies and kill bacteria (lysis), or alternatively, their genome can remain integrated in the bacterial genome (lysogeny). The translation of the *cIII* mRNA is determined by mutually exclusive structures in a switch-like fashion that masks the Shine–Dalgarno (SD) sequence at high temperature leading to expression of the lytic response [53].

Challenges in identifying RNATs and virulence factor thermoregulation

RNATs have little or no sequence conservation, so it is difficult to predict their presence from genome sequences [54]. However, some bioinformatic strategies have been devised [55–59] that consider some of the structural characteristics and the calculated thermodynamic parameters of the families of RNATs that have been described [60]. These bioinformatic strategies have not been completely successful in predicting functional RNATs, but they can be used as an indication of their possible presence. An example of a structure that was predicted to be an RNAT, but was determined to be dysfunctional when tested experimentally, is the one present in the phage shock gene D (*pspD*) in the *pspABCDE* operon of *E. coli* [60]. However, this bioinformatic strategy [60] was successful in predicting the presence of a ROSE (repression of heat-shock gene expression) RNAT in the 5' UTR of *P. aeruginosa* *rhlA*, and this ROSE RNAT was later shown to be functional and to play a major role in thermoregulation of the expression of virulence-related traits through the quorum sensing response (QSR) [61], as will be discussed further.

Based on the physicochemical characteristics of known RNATs, synthetic RNA thermosensors were designed, but the designed structures (one of them called seq1) were not functional and it was necessary to select point mutations that render seq1 a functional RNAT [62].

These results show that, although the main molecular characteristics of RNATs are known, there are still some important features that need to be understood, in order to have a method for discovering functional RNATs and to design RNA structures that can function as thermometers. The possibility of constructing synthetic RNATs is of theoretical and practical importance, because it shows that

the main characteristics of these RNA structures are understood, and it permits one to produce cloning vectors that may be used for the induction of proteins by temperature, and thus their expression *in vivo*.

A method that predicted and probed RNA structures based on high-throughput sequencing (called the RNA structurome [63]), was devised to study mainly the structural organization of a eukaryotic transcriptome. Based on this method, it was recently proposed that the use of this strategy, combined with modification of nucleotides that participate in RNA structures, could be used as a genome-wide method to detect bacterial RNATs [54]. This novel strategy combines the advanced bioinformatic strategies, which have achieved a good level of prediction for the presence of novel RNATs, with transcriptome information and modification of certain molecular interactions that participate in RNA structures, and might be a powerful tool in the global analysis of bacterial genomes to search for RNATs. However, this approach remains to be experimentally validated.

An alternative experimental strategy devising screening for *P. aeruginosa* genes that are thermoregulated has been reported [64]. This method is based on the expression of a gene library cloned in a plasmid that produces translational *rpsL3* fusions, and expressing this library in *E. coli* [64]. This strategy permitted the detection of four novel RNATs, one of them at the 5' UTR of *ptxS*. While this method represents a novel strategy for RNAT detection, it does not seem to be the best choice to detect the most relevant RNATs, since neither the *P. aeruginosa* ROSE elements involved in heat shock [65] nor those involved in thermoregulation of virulence factors [61] were identified with this screening method.

By contrast, some RNATs can be detected using transcriptome analysis, in the cases where mRNAs are degraded when they are not translated. This seems to be the case of the *P. aeruginosa* *lasI* gene coding for the synthase of the autoinducers 3-oxo-homoserine lactone (3-O-C12-HSL) that was detected analyzing *P. aeruginosa* genes that were differentially expressed at 25 and at 37°C using transcriptome analysis [61]. However, although the *lasI* ROSE-like element produces a big effect on the level of *lasI* mRNA and on its translation, the biological significance of this RNAT in the thermoregulation of *P. aeruginosa* QSR is questionable [61].

Thus, there are big challenges for devising screening methods to detect RNATs that are functionally significant

for the biology of pathogenic bacteria, including defining the biological settings to determine the effectiveness of the RNA structurome and other strategies that have been recently proposed [54,63].

Diverse structural characteristics of RNAT families

In order to give a general picture of the different structures that have been reported to function as RNATs, here, we briefly mention examples of RNATs in circumstances beyond the regulation of virulence, such as during the heat shock response (HSR).

HSR has been thoroughly studied in γ proteobacteria [65–68]. It has been reported that several levels of regulation participate in the expression of genes coding for chaperones and other proteins that participate in the cell response to temperature. A major part of this response is played by the RNAT that modulates the translation of the *rpoH* gene that encodes the RNA polymerase (RNAP) σ^H subunit, which is involved in the transcription of around 120 genes involved in the HSR (including small heat shock proteins, chaperones, and proteases) [66].

ROSE elements

As mentioned previously, some of the genes induced during the HSR code for small heat shock proteins, such as *ibpA* and *ibpB* (encoding inclusion body binding proteins). Some of the genes thus transcribed in turn contain RNATs in their 5' UTR in several α and γ proteobacteria called ROSE [69–71]. These elements are the best-characterized RNATs, and have been shown to thermoregulate the translation of the genes along a range of temperatures, in such a way that mRNAs have a low level of expression at temperatures around 20°C, and their translation is gradually increased as temperature increases, due to changes of the RNAT structure that partially expose the SD sequence

[41,54]. The first and best-characterized ROSE element is found upstream of the *Bradyrhizobium japonicum hspA* gene that encodes the heat shock protein A [72,73] (Table 2). The sequence of ROSE elements is not conserved, like other RNATs, but they show similar structural characteristics. Their structure consists of two to four stem loops going from 60 to >100 nucleotides in length. The 5' hairpin remains folded at higher temperatures, while the 3' proximal stem loop that harbors the RBS or SD sequence, and in some instances the AUG start codon, is only stable at low temperatures and melts as the temperature rises. This proximal stem contains a G (G83 in the *B. japonicum hspA* ROSE element, Table 2) that seems to be unpaired in the sequence that is opposite the RBS, although it has been shown by NMR studies that the structure is maintained by noncanonical base pairs that are fundamental for the sensing of temperature changes [74]. Heat-induced structural changes to this 3' proximal stem loop expose the SD sequence, allowing ribosome binding and mRNA translation [75].

ROSE elements are RNATs that are present in heat-shock-induced genes in many α and γ proteobacteria, but recently one of these elements has been shown to play a central role in the thermoregulation of virulence-related traits in *P. aeruginosa* [61]; this case will be further described in the next section.

Four U elements

There are several examples of genes involved in bacterial virulence that are thermoregulated by an RNAT of the four U (4U) element family [43,76,77]; some examples will be further described (Table 2). These RNATs are characterized by the presence of a stretch of four uridines, which pair with AGGA in the SD sequence. The best-studied case of a 4U element is involved in the thermoregulation of trans-

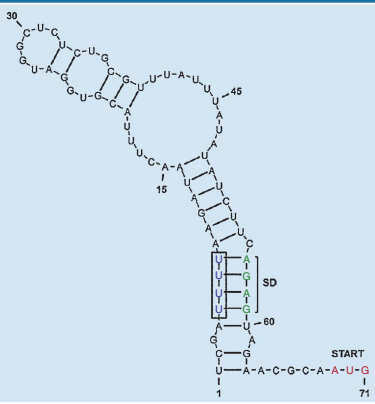
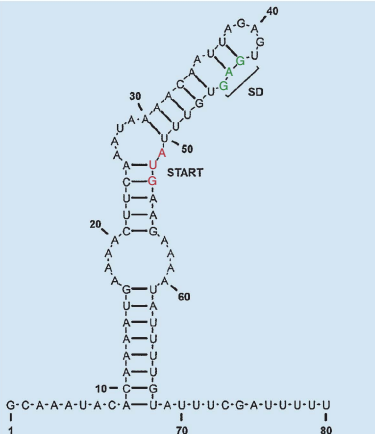
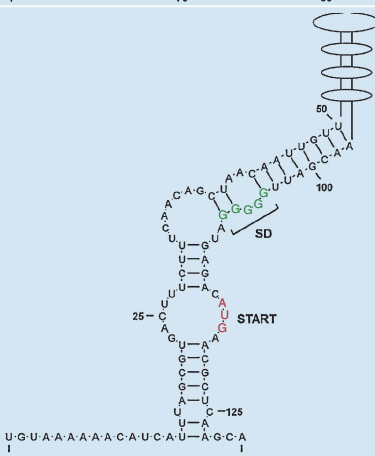
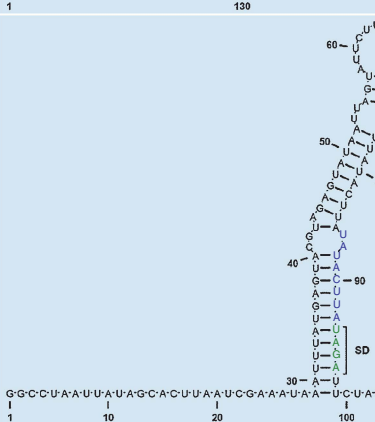
Table 2. Examples of RNA thermometers that participate in the regulation of virulence-related traits in different bacteria^a

Structure of the RNAT	Name	Regulated gene; protein or function	Bacterial species	Refs
	ROSE	<i>hspA</i> ; heat shock protein A	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	[65,72,73]
	ROSE	<i>rhlA</i> ; rhamnolipids synthesis; quorum sensing response	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[61]

Table 2 (Continued)

Structure of the RNAT	Name	Regulated gene; protein or function	Bacterial species	Refs
	ROSE-like	<i>lasI</i> ; quorum sensing response	<i>P. aeruginosa</i>	[61]
	4U	<i>agsA</i> ; small heat shock protein	<i>Salmonella enterica</i>	[74,75]
	4U	<i>IcrF/virF</i> ; transcriptional activator	<i>Yersinia pestis</i> ; <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	[27,80]
	4U	<i>shu/chu</i> ; heme-uptake system	<i>Shigella dysenteriae</i>	[95]

Table 2 (Continued)

Structure of the RNAT	Name	Regulated gene; protein or function	Bacterial species	Refs
 <p>30 45 15 SD 60 START 71 A-A-C-G-C-A-A-U-G</p>	4U	<i>toxT</i> ; transcriptional activator	<i>Vibrio cholerae</i>	[92]
 <p>40 30 SD 50 START 20 60 10 G-C-A-A-A-U-A-C-A-U-A-U-U-U-C-G-A-U-U-U-U-U 1 70 80</p>	NA	<i>ligA</i> , <i>ligB</i>	<i>Leptospira interrogans</i>	[33]
 <p>50 SD 100 START 25 125 U-G-U-A-A-A-A-C-A-U-C-A-U-A-G-C-A 1 130</p>	NA	<i>pfrA</i> ; transcriptional activator	<i>Listeria monocytogenes</i>	[52,79]
 <p>60 70 SD START 110 G-G-C-U-A-U-U-A-U-A-G-C-A-C-U-U-A-A-U-C-G-A-A-A-U-A-A-U-C-U-A-A-A-U-C-A-U-G 1 10 20 100 110</p>	NA	<i>cssA</i> ; exopolysaccharide biosynthesis	<i>Neisseria meningitidis</i>	[32]

^aNA indicates not assigned. The initiation codon (START) and the SD sequence are indicated. Bases or regions essential for thermosensing are shown in a blue color. In some, thermometer classification (ROSE or 4U) are in bold.

lation of the small heat shock gene that is involved in aggregation suppression (*agsA*) in *Salmonella enterica* (Table 2). The prediction of the *agsA* 4U element showed that it has two distinct hairpins; one of these hairpins is not affected by temperature, while the second hairpin, which includes the SD sequence and the stretch of four uridines, melts when temperature rises [76].

Some examples of bacterial virulence-related traits thermoregulated by RNATs

In the following sections, examples of RNATs in the regulation of virulence-related traits in different bacterial models are discussed (Table 2). This list is not exhaustive, but tries to reflect the diversity of molecular strategies of pathogenic bacteria and the traits that are regulated by RNATs.

A ROSE element regulates virulence-related traits in *P. aeruginosa*

P. aeruginosa is an important opportunistic pathogen that causes serious nosocomial infections that are difficult to treat due to its natural antibiotic resistance [24]. Moreover, it is the first cause of morbidity and mortality in patients with cystic fibrosis, which is the most frequent genetic disorder among Caucasian populations [78]. Many of its virulence-associated traits are regulated at the level of transcription by the QSR. The quorum sensing regulon is a hierarchical cascade that has two central transcriptional activators, LasR and RhlR, that when coupled with the 3-O-C12-HSL and butanoyl homoserine-lactone (C4-HSL), respectively, activate the expression of genes coding for virulence-associated traits [79]. LasR is at the top of the cascade since it activates the expression of *lasI* (encoding the 3-O-C12-HSL synthase), *rhlR*, and *rhlI* (coding for the C4-HSL synthase) [80]. Recently it was reported that traits that are dependent on RhlR have a higher expression at 37°C, due to a higher RhlR concentration that is caused by a post-transcriptional effect dependent on a ROSE-element present in the 5' UTR of the *rhlAB* operon (involved in the production of the rhamnolipid biosurfactants) and of the downstream *rhlR* gene, thus controlling the three genes in the *rhlAB-R* operon through a polar effect [61] (Figure 1).

This was the first description of a ROSE-element that is not involved in the HSR, but instead regulates the expression of virulence traits. A second ROSE-like element was described in the 5' UTR of *lasI*, but it was shown that it only played a marginal role in the thermoregulation of virulence-related traits in *P. aeruginosa* [61].

As mentioned above, RhlR is one of the central transcriptional regulators of the *P. aeruginosa* QSR, and similar to other bacterial pathogens the expression of virulence-associated factors is induced at the human body temperature, when the SD sequence is accessible to ribosomes. However, in contrast to other pathogenic bacteria such as *Yersinia* and *Listeria* that completely abrogate the expression of virulence traits at 30°C [81,82], *P. aeruginosa* retains a considerable level of virulence factor production at this temperature [83]. This pattern of thermoregulation enabled by the ROSE-element is in agreement with the ability of *P. aeruginosa* to establish pathogenic interactions not only with mammals, but also

with different hosts including flies [84], worms [85], and also plants [86]. Thus, the thermoregulation of the *P. aeruginosa* QSR by a ROSE RNAT is a fundamental part of the biological strategy of this bacterium to establish pathogenic interactions with warm-blooded animals, which implies a full induction of QSR, and with other organisms, expressing low levels of virulence factors.

The 5' UTR of *rhlA*, besides being involved in thermoregulation of RhlR-dependent expression of virulence factors, is the site of post-transcriptional regulation by a sncRNA called NrsZ that responds to nitrogen source availability [87]; the regulation by this sncRNA explains the fact that rhamnolipid production is higher in certain nitrogen sources, such as nitrate [88,89].

Regulation of virulence in *L. monocytogenes* through expression of *prfA*

L. monocytogenes is a ubiquitous bacterium that can grow at temperatures ranging from 5 to 45°C, but is also a food-borne pathogen causing severe infections, primarily in immunocompromised individuals and pregnant women [7].

Virulence-related traits are only expressed when *L. monocytogenes* is grown at 37°C because the expression of the master transcriptional regulator of virulence genes PrfA is thermoregulated. An RNAT (that is not a member of any of the described families of RNATs) is present in the 5' UTR of the *prfA* mRNA and blocks its translation, thereby preventing synthesis of this transcriptional activator at environmental temperatures [81]. At 37°C, the 5' UTR of the *prfA* mRNA is subject to *trans*-acting Sre riboswitches, responding to SAM binding [52,90]. Sre riboswitches participate at the post-transcriptional level in the expression of *L. monocytogenes* genes encoding enzymes of methionine and cysteine synthesis, by canonical *cis*-acting mechanisms. However, Sre riboswitches are also able to establish base-pairing interactions with the 5' UTR of the *prfA* mRNA that inhibit its translation at 37°C, thereby reducing PrfA expression [52,90].

ToxT expression is thermoregulated by a 4U element in *V. cholerae*

V. cholerae is the causative agent of cholera that is responsible for serious pandemics; there have been reports of this severe diarrheal disease for at least a millennium [91]. A recent epidemic took place in 2010 in Haiti, following a severe earthquake [91] (<http://www.scientificamerican.com/article/mapping-cholera-tale-of-2-cities/>). *V. cholerae* can survive in different water bodies that have low temperatures and when it enters the human intestine it is exposed to a temperature of 37°C. Within the intestine, *V. cholerae* expresses virulence factors involved in the production of diarrhea, such as the cholera toxin (CT) and the toxin coregulated pilus (TCP). The genes coding for CT and TCP are activated at the level of transcription by the protein ToxT [92]. Recently, it was reported that a 4U element is present in the 5' UTR of *toxT* that blocks ribosome access to the RBSs at low temperature [93]. In this report, mutations that strengthened base-pairing between the anti-SD and SD sequences were selected; it was shown that these mutations prevented ToxT expression

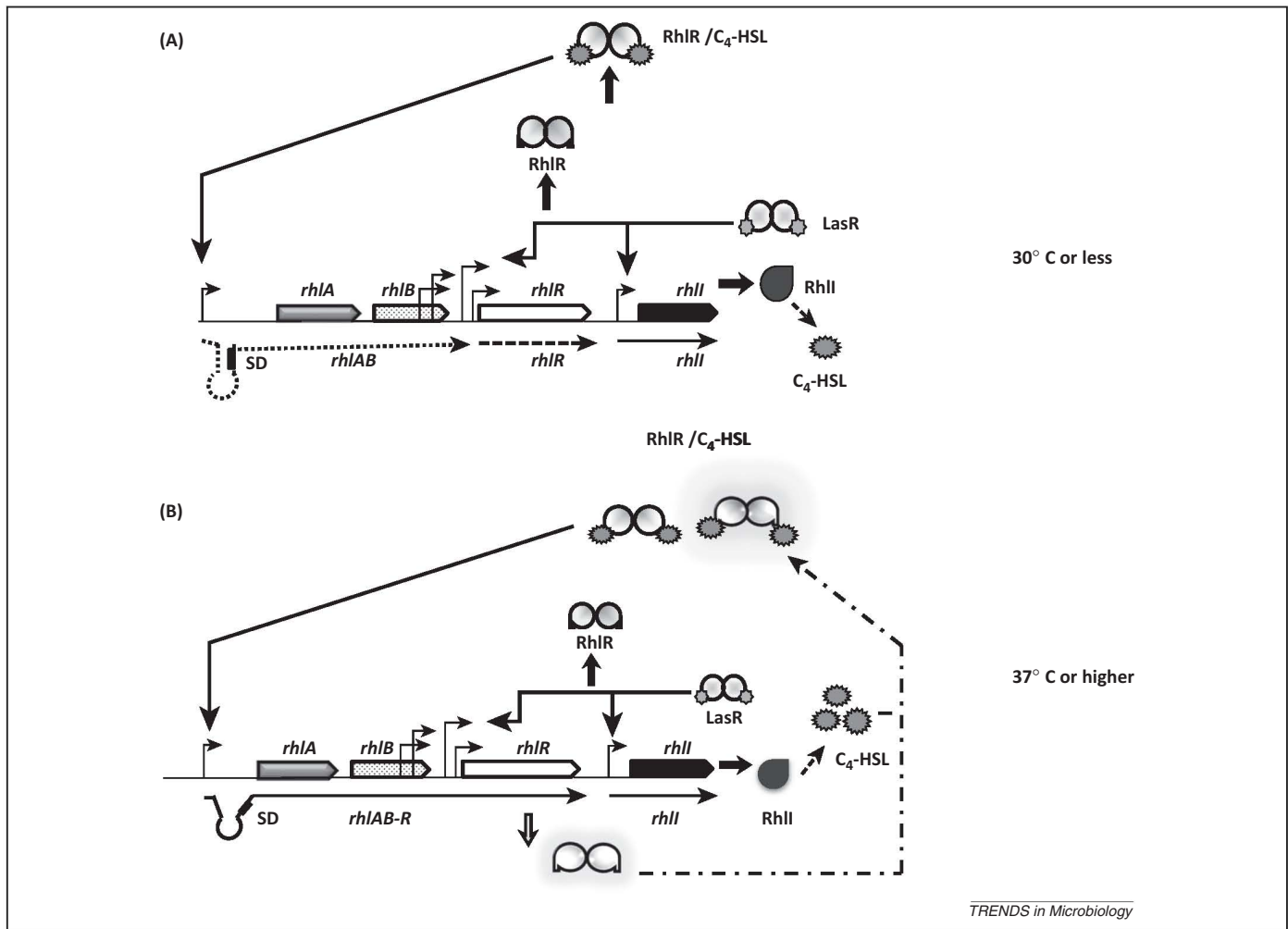


Figure 1. Schematic representation of *rhIR* transcriptional regulation from its five promoters showing the role of the ROSE element at the 5' *rhIA* untranslated region in the autoregulatory loop present at 37°C. At 30°C or lower temperatures (A) the structure formed in the mRNA by the ROSE element partially blocks the *rhIA* SD sequence, while at 37°C or higher temperatures (B), the SD sequence is exposed for the binding of ribosomes and translation proceeds. At the human body temperature, the *rhIAB-R* operon is transcribed and translated, resulting in an increased RhIR concentration and hence virulence-associated traits are activated by this transcriptional factor. This figure was published in the supplementary material of reference [61] and is published with permission of the Proceedings of the National Academy of Sciences USA. Abbreviations: ROSE, repression of heat-shock gene expression; SD, Shine-Dalgarno.

even at 37°C and that *V. cholerae* mutants containing these mutations in the *toxT* 5' UTR were unable to colonize the infant mouse small intestine. These results show that the *toxT* 4U element is responsible for the thermoregulation of *V. cholerae* virulence [93].

Thermoregulation by a 4U element in *Yersinia*

Human pathogenic *Yersinia* spp. include at least three important pathogens: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Y. pestis* was responsible for some of the most devastating plagues in the medieval world, killing almost half of the population of Europe during the 14th Century [94]. Today, *Y. pestis* infects a few thousand people every year, mainly in Africa and Asia, but the disease it causes is mild and can be treated with antibiotics [95].

The virulence of these *Yersinia* species is dependent on a well-conserved 70-kb virulence plasmid, called pYV that codes for the *yop* effector proteins and the type III secretion system, encoded by the *ysc* genes [95]. These crucial virulence genes for virulence are regulated at the level of

transcription by the LcrF (also called VirF) activator [23,27].

Using *Y. pseudotuberculosis* as a model, it was reported that LcrF production was thermoregulated by a complex mechanism involving both the regulation at the level of transcription of the *yscW-lcrF* operon by the thermo labile repressor YmoA (*Yersinia* modulator A) and by a 4U element present in the 5' UTR of *lcrF* (intergenic region between *yscW* and *lcrF*) that blocks LcrF translation at environmental temperatures [96]. YscW is a lipoprotein that is required for assembling the type III secretion apparatus and is thus involved in bacterial virulence. Transcription of the *yscW-lcrF* operon occurs from a house-keeping σ 70-dependent promoter, that is repressed by YmoA at 30°C, since at 37°C this small histone-like protein is rapidly degraded, and hence transcription of the operon proceeds. The crucial role of the 4U RNAT present in the *lcrF* 5' UTR, in the expression of *Yersinia* virulence-related traits was shown by the reduced virulence of a *Y. pseudotuberculosis* mutant with a stabilized variant of this 4U element.

Heme-utilization in *Shigella* and pathogenic *E. coli*

When bacteria infect the human body they have to possess a strategy to obtain iron, which is present at low concentrations. To do this, some pathogens contain a specific heme-degradation pathway that includes outer membrane proteins that act as receptors for heme, that enable them to use heme as an iron source [97]. This heme-uptake strategy to acquire iron during infection is used by different *Shigella* species and by pathogenic *E. coli*, using orthologous genes (called *shu* in *Shigella* and *chu* in pathogenic *E. coli*) [98]. *Shigella dysenteriae* and other types of *Shigella*, cause severe diarrhea and are estimated to produce >1 million deaths annually [6], and together with pathogenic *E. coli*, they are considered to be a major global health problem [98]. The presence of a heme uptake system in uropathogenic, enterohemorrhagic, and enteroaggregative *E. coli* correlate with virulence [99]; this heme-uptake system is not present in the laboratory *E. coli* K12 strain [100]. The expression of the systems for acquisition and utilization of heme is usually regulated by iron limitation, the presence of heme, and by the temperature of the human body. Recently it was reported that the translation of *S. dysenteriae shuA* is thermoregulated by a 4U RNA element and that this RNAT is conserved in other *Shigella* and pathogenic *E. coli* [82].

In these pathogenic enteric bacteria, the expression of heme-uptake systems (ShuA or ChuA) is regulated at the level of transcription by Fur-dependent repression, so *shuA* and *chuA* mRNA are only produced in the absence of iron, and these mRNAs are only translated at 37°C, when the 4U RNAT present in the 5' UTR melts and the RBS is exposed.

RNAT is involved in thermoregulation of *Leptospira* interrogans LigA and LigB lipoproteins

Lep. interrogans is one of the pathogenic members of the genus *Leptospira*, the causing agent of the febrile illness leptospirosis that is a global zoonosis.

Infected animal hosts secrete *Lep. interrogans* in the urine, and humans can be infected through skin lesions or mucous tissues that are in contact with contaminated water or soil. The detailed mechanism of infection of this spirochete is not known because it is not amenable to genetic manipulation, but it has been determined that some traits are differentially expressed during the spirochete life cycle [101]. Among proteins that have been shown to be involved in *Lep. interrogans* virulence are the multi-adhesine lipoproteins LigA and LigB. It has been recently reported [33] that both the *ligA* and *ligB* genes contain an identical sequence that starts 266 nucleotides upstream of their translational start codon and that a two stem loop RNAT is encoded in these reiterated 5' UTR sequences. The proximal stem loop includes the SD sequence and is sufficient to confer thermoregulation of LigA and LigB expression [33].

Role of thermoregulation in *N. meningitidis* infections

All the examples presented above correspond to facultative pathogens, but the case of *N. meningitidis* is different, because it is an obligate commensal of the human nasopharynx, and thus it is not expected that

temperature changes would be important in the regulation of virulence associated traits. In fact, a high proportion (10–20%) of healthy individuals contain this bacterium as a commensal.

However, although it is a commensal organism, *N. meningitidis* can cause severe infections by expressing refined mechanisms to avoid immune surveillance, correlating with influenza outbreaks [32,102,103]. The mechanisms *N. meningitidis* uses to evade the immune system during disease, include the production of exopolysaccharide (EPS), modification of lipopolysaccharide (LPS), and recruitment of complement regulatory factor H, by the interaction with factor H binding protein [104].

CssA is an enzyme that catalyzes an early step in EPS biosynthesis and is encoded by the first gene of the *css* operon. The 5' UTR of *cssA* contains copies of an 8-bp sequence that participates in the formation of an RNAT that occludes the SD sequence. This structure is destabilized at 42°C, the temperature that is reached during *N. meningitidis* and viral co-infections, instead of at 37°C as RNATs of other bacterial pathogens [32]. Similar RNATs were found upstream of genes *fHbp* and *lst* coding for factor H binding protein (which recruits the host complement regulator factor H) and Lst (necessary for lipopolysaccharide sialylation), respectively [32]. The expression of *N. meningitidis* virulence-associated traits at 42°C during inflammation of the nasopharynx due to viral co-infection causes *N. meningitidis* to modify its lifestyle from a commensal to become a pathogen [32].

Concluding remarks

Thermoregulation of virulence-related traits is a finely tuned process, which has a high biological significance for different bacterial pathogens. We have described diverse cases of RNATs that participate in regulation of the expression of virulence-associated traits under different temperatures, pointing out the relevance that this thermoregulation has on the life cycle of pathogens.

We have also highlighted that the regulation of genes coding for virulence-associated traits by RNATs is a widespread phenomenon among bacteria, but that there is no sequence conservation among RNATs, although belonging to families of structures, such as the ROSE or 4U elements. Thus, it is apparent that thermoregulation of virulence-associated traits in pathogenic bacteria through RNATs is a molecular mechanism that has been selected in multiple times and settings in the evolution of pathogenic interactions. In all cases where gene translation is regulated by RNATs, there are common themes, such as the velocity and reversibility of structural changes, that enable bacteria to have an immediate response to environmental changes that are relevant to bacterial pathogen lifestyle, such as colonization of the human body, versus survival in water, soil, or air.

There has been great advancement in research concerning the field of bacterial response to temperature changes, especially related to the involvement of RNATs in gene translation, but there are still several questions that need to be addressed (Box 1). One of the greatest challenges that we face is to develop experimental settings that can explore in a global manner the presence of functional RNATs, and

Box 1. Outstanding questions

- How can very diverse genetic regulatory circuits of virulence-associated traits in pathogenic bacteria be induced by the human body temperature?
- What are common features of the proteins that are thermoregulated by RNATs?
- How are the different structural families of RNATs selected to regulate the expression of heat shock or virulence-related traits?
- Is it common that RNATs are the target of regulation by small non-coding-RNAs?
- How can we predict the functionality of a putative RNAT detected by bioinformatics approaches on a genome-wide scale?

the genetic circuits that are regulated by their activity. There is a robust dataset of structures that have the physicochemical characteristics to be RNATs [60], and genome-wide approaches to deal with this problem have been proposed [54], so there is a good chance that this challenge can be addressed in the near future.

References

- 1 Finlay, B.B. and Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 136–169
- 2 Henkel, J.S. *et al.* (2001) Toxins from bacteria. *EXS* 100, 1–29
- 3 Kline, K.A. *et al.* (2009) Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* 5, 580–592
- 4 Lihong, C. *et al.* (2012) VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Res.* 40, D641–D645
- 5 Schroeder, G.N. and Hilbi, H. (2008) Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 134–156
- 6 Zaidi, M.B. and Estrada-García, T. (2014) *Shigella*: a highly virulent and elusive pathogen. *Curr. Trop. Med. Rep.* 1, 81–87
- 7 Freitag, N.E. *et al.* (2009) *Listeria monocytogenes* – from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 623
- 8 Camejo, A. *et al.* (2011) The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence* 2, 379–394
- 9 Wolfgang, M.C. *et al.* (2003) Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8484–8489
- 10 Grosso-Becerra, M.V. *et al.* (2014) *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics* 15, 318
- 11 Klockgether, J. *et al.* (2011) *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front. Microbiol.* 2, 150
- 12 Sánchez, D. *et al.* (2014) Genome analysis of environmental and clinical *P. aeruginosa* isolates from sequence type-1146. *PLoS ONE* 9, e107754
- 13 Sabaté, M. *et al.* (2006) Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 880–886
- 14 Gal-Mor, O. and Finlay, B.B. (2006) Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell. Microbiol.* 8, 1707–1719
- 15 Clements, A. *et al.* (2012) Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 3, 71–87
- 16 Johnson, T.J. and Nolan, L.K. (2009) Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73, 750–774
- 17 Croxen, M.A. *et al.* (2013) Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 569–584
- 18 Faruque, S.M. and Mekalanos, J.J. (2003) Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. *Trends Microbiol.* 11, 505–510
- 19 Hazen, T.H. *et al.* (2010) The contribution of mobile genetic elements to the evolution and ecology of *Vibrios*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 485–499
- 20 Faruque, S.M. and Mekalanos, J.J. (2012) Phage bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence* 3, 1–10
- 21 Chavada, R. *et al.* (2014) Uncommon manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. *BMC Infect. Dis.* 14, 641
- 22 Gal-Mor, O. *et al.* (2014) Same species, different diseases: how and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Front. Microbiol.* 5, 391
- 23 Heroven, A.K. and Dersch, P. (2014) Coregulation of host-adapted metabolism and virulence by pathogenic *yersiniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 146
- 24 Driscoll, J.A. *et al.* (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 67, 351–368
- 25 Gellatly, S.L. and Hancock, R.E.W. (2013) *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host. *Pathog. Dis.* 67, 159–173
- 26 Pizza, M. and Rappuoli, R. (2015) *Neisseria meningitidis*: pathogenesis and immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 23, 68–72
- 27 Hoe, N.P. and Goguen, J.D. (1993) Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J. Bacteriol.* 175, 7901–7909
- 28 Chowdhury, R. *et al.* (1996) Stress response in pathogenic bacteria. *J. Biosci.* 21, 149–160
- 29 Straley, S.C. and Perry, R.D. (1995) Environmental modulation of gene expression and pathogenesis in *Yersinia*. *Trends Microbiol.* 3, 310–317
- 30 Konkel, M.E. and Tilly, K. (2000) Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect.* 2, 157–166
- 31 Horzempa, J. *et al.* (2008) Global transcriptional response to mammalian temperature provides new insight into *Francisella tularensis* pathogenesis. *BMC Microbiol.* 8, 172
- 32 Loh, E. *et al.* (2013) Temperature triggers immune evasion by *Neisseria meningitidis*. *Nature* 502, 237–244
- 33 Matsunaga, J. *et al.* (2013) Role for cis-acting RNA sequences in the temperature-dependent expression of the multiadhesive Lig proteins in *Leptospira interrogans*. *J. Bacteriol.* 195, 5092–5110
- 34 Weber, G.G. *et al.* (2014) RNA thermometer controls temperature-dependent virulence factor expression in *Vibrio cholera*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 14241–14246
- 35 Steinmann, R. and Dersch, P. (2013) Thermosensing to adjust bacterial virulence in a fluctuating environment. *Future Microbiol.* 8, 85–105
- 36 Schumann, W. (2012) Thermosensor systems in eubacteria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 739, 1–16
- 37 Klinkert, B. and Narberhaus, F. (2009) Microbial thermosensors. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2661–2676
- 38 Digel, I. *et al.* (2008) Molecular processes in biological thermosensation. *J. Biophys.* 2008, 60287
- 39 Kamp, H.D. and Higgins, D.E. (2011) A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog.* 7, e1002153
- 40 Harikrishnan, H. *et al.* (2013) Temperature-regulated expression of outer membrane proteins in *Shigella flexneri*. *Gut Pathog.* 5, 38
- 41 Kortmann, J. and Narberhaus, F. (2012) Bacterial RNA thermometers: molecular-zippers and switches. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 255–265
- 42 Rinnenthal, J. *et al.* (2010) Direct observation of the temperature-induced melting process of the *Salmonella* fourU RNA thermometer at base-pair resolution. *Nucleic Acids Res.* 38, 3834–3847
- 43 Krajewski, S.S. and Narberhaus, F. (2014) Temperature-driven differential gene expression by RNA thermosensors. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 978–988
- 44 Serganov, A. and Patel, D.J. (2014) Metabolite recognition principles and molecular mechanisms underlying riboswitch function. *Annu. Rev. Biophys.* 41, 343–370
- 45 Peselis, A. and Serganov, A. (2014) Themes and variations in riboswitch structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 908–918
- 46 Price, I.R. *et al.* (2014) Common themes and differences in SAM recognition among SAM riboswitches. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 931–938
- 47 Serganov, A. and Nudler, E. (2013) A decade of riboswitches. *Cell* 152, 17–24
- 48 Mellin, J.R. *et al.* (2014) Riboswitches. Sequestration of a two-component response regulator by a riboswitch-regulated noncoding RNA. *Science* 345, 940–943
- 49 Papenfort, K. and Vogel, J. (2010) Regulatory RNA in bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* 8, 116–127

- 50 Bobrovskyy, M. and Vanderpool, C.K. (2013) Regulation of bacterial metabolism by small RNAs using diverse mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* 47, 209–232
- 51 Michaux, C. et al. (2014) Physiological roles of small RNA molecules. *Microbiology* 160, 1007–1019
- 52 Loh, E. et al. (2009) A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 139, 770–779
- 53 Altuvia, S. et al. (1989) Alternative mRNA structures of the *cIII* gene of bacteriophage lambda determine the rate of its translation initiation. *J. Mol. Biol.* 210, 265–280
- 54 Righetti, F. and Narberhaus, F. (2014) How to find RNA thermometers. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 18, 132
- 55 Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415
- 56 Hofacker, I.L. (2003) Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3429–3431
- 57 Churkin, A. et al. (2014) RNATHERMSW: direct temperature simulations for predicting the location of RNA thermometers. *PLoS ONE* 9, e94340
- 58 Seetin, M.G. and Mathews, D.H. (2012) RNA structure prediction: an overview of methods. *Methods Mol. Biol.* 905, 99–122
- 59 Madanecki, P. et al. (2014) RNA Digest: a web-based tool for the analysis and prediction of structure-specific RNase digestion results. *PLoS ONE* 9, e96759
- 60 Waldminghaus, T. et al. (2007) Genome-wide bioinformatic prediction and experimental evaluation of potential RNA thermometers. *Mol. Genet. Genomics* 278, 555–564
- 61 Grosso-Becerra, M.V. et al. (2014) Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by two novel RNA thermometers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 15562–15567
- 62 Waldminghaus, T. et al. (2008) Generation of synthetic RNA-based thermosensors. *Biol. Chem.* 389, 1319–1326
- 63 Wan, Y. et al. (2011) Understanding the transcriptome through RNA structure. *Nat. Rev. Genet.* 12, 641–655
- 64 Delvillani, F. et al. (2014) Tet-Trap, a genetic approach to the identification of bacterial RNA thermometers: application to *Pseudomonas aeruginosa*. *RNA* 20, 1–14
- 65 Yura, T. et al. (1993) Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 321–350
- 66 Morita, M. et al. (1999) Heat induced synthesis of σ^{32} in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure. *J. Bacteriol.* 181, 401–410
- 67 Nocker, A. et al. (2001) A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat-shock genes. *Nucleic Acids Res.* 29, 4800–4807
- 68 Cimdins, A. et al. (2013) Differential control of *Salmonella* heat shock operons by structured mRNAs. *Mol. Microbiol.* 89, 715–731
- 69 Waldminghaus, T. et al. (2005) RNA thermometers are common in α - and γ -proteobacteria. *Biol. Chem.* 386, 1279–1286
- 70 Waldminghaus, T. et al. (2009) The *Escherichia coli* *ibpA* thermometer is comprised of stable and unstable structural elements. *RNA Biol.* 6, 455–463
- 71 Krajewski, S.S. et al. (2013) Short ROSE-like RNA thermometers control *IbpA* synthesis in *Pseudomonas* species. *PLoS ONE* 8, e65168
- 72 Narberhaus, F. et al. (1998) A novel DNA element that controls bacterial heat shock gene expression. *Mol. Microbiol.* 28, 315–323
- 73 Nocker, A. et al. (2001) ROSE elements occur in disparate rhizobia and are functionally interchangeable between species. *Arch. Microbiol.* 176, 44–51
- 74 Chowdhury, S. et al. (2006) Molecular basis for temperature sensing by an RNA thermometer. *EMBO J.* 25, 2487–2497
- 75 Chowdhury, S. et al. (2003) Temperature-controlled structural alterations of an RNA thermometer. *J. Biol. Chem.* 278, 47915–47921
- 76 Waldminghaus, T. et al. (2007) FourU: a novel type of RNA thermometer in *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* 66, 413–424
- 77 Rinnenthal, J. et al. (2011) Modulation of the stability of the *Salmonella* fourU-type RNA thermometer. *Nucleic Acids Res.* 39, 8258–8270
- 78 Davis, P.B. (2001) Cystic fibrosis. *Pediatr. Rev.* 22, 257–264
- 79 Soberón-Chávez, G. et al. (2005) Is *Pseudomonas aeruginosa* only sensing quorum? *Crit. Rev. Microbiol.* 31, 171–182
- 80 Williams, P. and 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
- 81 Johansson, J. et al. (2002) An RNA-thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110, 551–561
- 82 Kouse, A.B. et al. (2013) RNA-mediated thermoregulation of iron-acquisition genes in *Shigella dysenteriae* and pathogenic *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 8, e63781
- 83 Wurtzel, O. et al. (2012) The single-nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body temperature. *PLoS Pathog.* 8, e1002945
- 84 D'Argenio, D.A. et al. (2002) *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J. Bacteriol.* 183, 1466–1471
- 85 Tan, M.W. and Ausubel, F.M. (2000) *Caenorhabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 29–34
- 86 Rahme, L.G. et al. (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 13245–13250
- 87 Wenner, N. et al. (2014) NrsZ: A novel, processed, nitrogen-dependent, small non-coding RNA that regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence. *Environ. Microbiol.* 16, 1053–1068
- 88 Santos, A.S. et al. (2002) Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of rhamnolipids by a strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98–100, 1025–1035
- 89 Mulligan, C.N. and Gibbs, B.F. (1989) Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3016–3019
- 90 Yayarath, B. and Freitag, N.E. (2009) A bacterial pathogen flips the riboswitch. *Cell Host Microbe* 6, 400–402
- 91 Morris, J.G., Jr (2011) Cholera-Modern pandemic disease of ancient lineage. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2099–2104
- 92 Childers, B.M. and Klose, K.E. (2007) Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*: The ToxR regulon. *Future Microbiol.* 2, 335–344
- 93 Weber, G.G. et al. (2014) RNA thermometer controls temperature-dependent virulence factor expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 14241–14246
- 94 Cornelis, G.R. et al. (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1315–1352
- 95 Gibbons, A. (2013) On the trail of ancient killers. *Science* 340, 1278–1282
- 96 Böhme, K. et al. (2012) Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA-thermosensor control *Yersinia* virulence. *PLoS Pathog.* 8, e1002518
- 97 Contreras, H. et al. (2014) Heme uptake in bacterial pathogens. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 19, 34–41
- 98 Qadri, F. et al. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: Epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 465–483
- 99 Okeke, I.N. et al. (2004) Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 36–44
- 100 Blattner, F.R. et al. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277, 1453–1462
- 101 Monahan, A.M. et al. (2008) Proteomic analysis of *Leptospira interrogans* shed in urine of chronically infected hosts. *Infect. Immun.* 76, 4952–4955
- 102 Bjornson, A.B. et al. (1991) Complement is activated in the upper respiratory tract during influenza virus infection. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143, 1062–1066
- 103 Cartwright, K.A. et al. (1991) Influenza A and meningococcal disease. *Lancet* 338, 554–557
- 104 Schneider, M.C. et al. (2009) *Neisseria meningitidis* recruits factor H using protein mimicry of host carbohydrates. *Nature* 458, 890–893

5. DISCUSIÓN GENERAL

El mecanismo denominado QS es utilizado por algunas bacterias patógenas tanto para modular la producción de factores de virulencia como para adaptarse y sobrevivir en condiciones hostiles. El encontrar un nuevo huésped o colonizar un determinado ambiente, implica la activación o “encendido” de un grupo de genes cuyos productos requiera ante el nuevo reto y en el “apagado” de otros, cuya producción no es necesaria e implican un gasto energético. Sin embargo, el cómo los estímulos ambientales y el QS son integrados en un patógeno para permanecer en un entorno en particular, continúa siendo un tema de estudio en constante desarrollo^{120,146}.

La temperatura es un factor vital para todas las bacterias y la respuesta a las fluctuaciones de la misma requiere de diversos sistemas termosensores. La respuesta general al estrés por temperatura (frío o calor), se basa en la sobre expresión de un grupo de proteínas llamadas CSP o HSP respectivamente; no obstante, en patógenos de humanos, incrementos menos drásticos en la temperatura no siempre inducen respuestas de choque, pero son suficientes para activar la producción de algunos factores de virulencia, ya que son indicativos de la entrada exitosa a un huésped¹⁸⁵.

P. aeruginosa es una bacteria ubicua y puede crecer a temperaturas que oscilan entre los 4°C hasta los 42°C²⁰; así mismo, es un importante patógeno oportunista de humanos y otros mamíferos donde las condiciones de temperatura, son constantes y cercanas a los 37°C. Por otro lado, en otros hospederos en los que causa también infecciones tales como nemátodos, insectos y plantas, las temperaturas son inferiores y muchos de los determinantes de virulencia son también producidos en estas condiciones¹⁷. Lo anterior, pone de manifiesto que la virulencia en esta bacteria, no es exclusivamente expresada a 37°C y que por el contrario, es modulada por las temperaturas ambientales.

Se ha documentado ampliamente, la importancia de la respuesta QS en la regulación de la virulencia y en la capacidad de responder a estímulos ambientales en *P. aeruginosa*¹⁴⁶. En este trabajo, se pudo establecer el efecto de la temperatura y su impacto sobre el sistema de QS en esta bacteria. Los resultados muestran incrementos cercanos al 50% en la producción de dos factores de virulencia importantes y regulados directamente por el sistema RhlR/C4-HSL, los ramnolípidos (RLs) y la píocianina (PCN), cuando la bacteria se crece a 37°C. Así mismo,

mediante la construcción de fusiones reporteras, se estableció que la temperatura tiene un efecto a nivel de la transcripción de *rhlA*, el cual es parte del operón *rhlAB-R* involucrado en la biosíntesis de los RLs; del operón *phzA1-G1*, responsable de la producción de la fenazina PCA, sustrato para la obtención de PCN; y el gen *lecA*, el cual codifica para una proteína que funciona como adhesina.

Como posteriormente se determinó, el efecto de la temperatura reside en el regulón RhlR y está relacionado con las concentraciones intracelulares del regulador RhlR y no del complejo LasR/3-o-C12-HSL, el cual inicia la cascada del sistema QS¹¹⁷. Mediante ensayos de inmunodetección de proteínas (Western-blot), se pudo determinar que las cantidades del regulador RhlR a 37°C son significativamente mayores respecto de las observadas a 30°C y dichas diferencias no dependen de la transcripción misma de *rhlR* a partir de alguno de sus cuatro promotores ya descritos^{114,128}. El operón *rhlAB-R* es regulado por el complejo RhlR/C4-HSL y la expresión de *rhlR* está mediada por un circuito de autorregulación positivo a 37°C¹⁵⁴. La prevalencia de dicho circuito a temperaturas inferiores fue establecida en una mutante *rhlR::Tn⁺lacZ*, la cual tiene una inserción cromosomal del gen *lacZ* en fase y permite evaluar la expresión de *rhlR* en su contexto; esta mutante fue complementada con el plásmido pGMYC, el cual expresa *rhlR* bajo el promotor *lacZ*. Los resultados obtenidos nos sugieren que la transcripción de *rhlR* a 30°C solo se da a partir del promotor P_I, regulado positivamente por LasR/3-o-C12-HSL, mientras que a 37°C se hace también a partir del promotor presente en *rhlA*, el cual es dependiente de RhlR/C4-HSL y contribuye al incremento de la cantidad de este regulador a altas temperaturas, confirmando lo observado en los ensayos de Western-blot. Además, la interrupción del circuito de autorregulación positiva de *rhlR* mediante una mutación en *rhlA* y la obtención de los mismos niveles de RhlR a 30°C y 37°C en este fondo genético, permitió corroborar que la termorregulación de *rhlR* solo sucede cuando se expresa desde el promotor de *rhlA*.

Posteriormente, el análisis *in silico* de la 5'-UTR de *rhlA* con programas de predicción de estructuras de ARN²⁶⁰, permitió identificar una estructura secundaria que abarca 110 pb y cuya presencia podría explicar en parte, la termorregulación de *rhlAB-R*. De acuerdo con sus características estructurales y de plegamiento, tiene elementos comunes a los termómetros de ARN (ARNT) denominados elementos ROSE²¹⁶: una estructura secundaria formada por 2 tallo-asa, una secuencia (anti-SD) que hibrida con el SD, limitando su acceso al ribosoma y una

guanina (G) desapareada en la secuencia anti-SD, la cual es necesaria para funcionar como termómetro, localizada en la posición 78 (G78). Aunque dicha estructura se encontró también en la base de datos RNA-SURIBA²⁶¹, la cual contiene las secuencias y la predicción *in silico* de posibles estructuras secundarias presentes en los 5'-UTRs de todos los genes anotados y que codifican para proteínas en el genoma de *P. aeruginosa* PAOI, la funcionalidad de la misma no se había determinado. Además, la alta conservación de esta estructura en todos los genomas reportados hasta la fecha, permite suponer la importancia de la misma como mecanismo regulador de la virulencia en este patógeno. Recientemente, esta estructura se propuso también como sitio de reconocimiento de un sRNA (NrsZ), el cual regula la traducción de *rhlA* en respuesta a la deprivación por nitrógeno²⁵⁹.

La posible participación del elemento ROSE en la termorregulación de *rhlA* se comprobó mediante fusiones traduccionales de la estructura silvestre y de sus mutantes, utilizando un sistema biosensor, el plásmido pBAD18-*lacZ*481²³³. La delección de la G de la posición 78 (Δ G78), estabiliza (cierra) el tallo-asa que secuestra el SD y reprime la expresión a 30 y 37°C, mientras que la sustitución de base (G92A), reduce la estabilidad de la porción termosensora e incrementa significativamente la expresión a ambas temperaturas. Los resultados obtenidos, demuestran que el elemento ROSE modula la traducción de *rhlA* y este mecanismo además, acopla la transcripción del operón *rhlAB-R*, mediante un efecto polar a 30°C. Es importante mencionar que aparentemente no existe un terminador transcripcional entre *rhlB* y *rhlR* que pudiera explicar, la terminación de la transcripción de *rhlAB-R*, cuando la traducción de *rhlA* es reducida; sin embargo, estructuras putativas de terminación, presentes en el ARNm de *rhlA*, serían las encargadas de finalizar prematuramente la transcripción del operón y de esta forma ejercer el efecto polar sobre la expresión de *rhlB*.

Como ya se mencionó, los efectos de la temperatura sobre el sistema QS, están asociados a las concentraciones de RhlR. Para descartar efectos indirectos relacionados con LasR, se determinaron de igual forma, las concentraciones intracelulares de este regulador; el efecto de la temperatura sobre la transcripción por análisis de PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR) de *lasR*; y una región de 110 pb, de la 5'-UTR de *lasR*, la cual no forma estructuras secundarias asociadas a termómetros de ARN, fue evaluada en el mismo sistema biosensor utilizado para *rhlA*. En los análisis mencionados, no se encontraron diferencias en la expresión

de LasR, confirmando que la termorregulación de QS está únicamente asociada al regulón RhlR.

La concentración de los autoinductores juega un papel primordial en la respuesta QS^{122,124,125}; sin embargo, no se esperaron incrementos importantes en su producción, debido al papel regulatorio que tiene LasR sobre las sintasas, RhlI y LasI, responsables de su biosíntesis¹²². No obstante, de acuerdo con los resultados obtenidos, el principal efecto se evidenció en las concentraciones de C4-HSL y en menor grado sobre las de 3-o-C12-HSL. Además, se descartó el posible efecto de las cantidades de RhlR a 37°C, sobre la producción de estos AIs, en el fondo genético de una mutante *rhlR*. La concentración de los mismos, fueron similares a las obtenidas con la cepa silvestre y se propone que posiblemente, la producción de C4-HSL, esté termorregulada a través de LasR/3-o-C12-HSL, aunque no se descarta que la disponibilidad de los substratos requeridos para la biosíntesis de los mismos, esté influenciada por la tasa metabólica a 37°C. Por otro lado, la termorregulación del regulón RhlR podría ser potenciada a través del incremento en las concentraciones de C4-HSL a 37°C. Así mismo, el efecto de la temperatura sobre la expresión de los genes de las sintasas *rhlI* y *lasI*, se evidenció en los análisis de qRT-PCR y contrario a lo observado con las concentraciones de AIs, el nivel de expresión a 37°C, fue superior en *lasI*, y en menor grado el obtenido en *rhlI*.

Otra estructura, aunque no relacionada con los elementos ROSE y denominadas ROSE-like, se encontró en la región promotora de *lasI* y podría regular aunque de forma marginal, la producción de 3-o-C12-HSL. Además, no se observan efectos sobre la expresión de *lasB* ni sobre la producción de la elastasa LasB, la cual es regulada por el complejo LasR/ 3-o-C12-HSL¹²⁶.

Por último, a través del análisis de un transcriptoma, se obtuvo un panorama global respecto de los efectos de la temperatura sobre la respuesta de QS en *P. aeruginosa*. Las células utilizadas en dicho análisis fueron crecidas en el medio de cultivo PPGAS, a 25°C y 37°C. De acuerdo con los resultados obtenidos, los genes *rhlA*, *rhlB* y *rhlR*, mostraron una reducción de su expresión a 25°C, aunque dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, considerando los mecanismos descritos e involucrados en su regulación, es importante la búsqueda de otras estrategias de análisis que proporcionen mayor sensibilidad. Adicionalmente, algunos de los genes involucrados en la producción de PCN mostraron una

reducción en su expresión, lo cual confirma el significado biológico de la termorregulación de RhlR.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo permitieron demostrar que la reducción en la expresión y producción de los factores de virulencia, regulados por RhlR/C4-HSL, está mediada así mismo, por la disminución de la expresión del gen *rhlR* a partir del promotor de *rhlA*. Esta termorregulación, involucra un elemento ROSE presente en la 5'-UTR del *rhlA*, el cual, modula su traducción y acopla en su mecanismo, la expresión de *rhlB* y *rhlR*. Este elemento ROSE, es el primero de esta clase de ARNT, asociado con la regulación de un factor de virulencia y con la expresión diferencial de los componentes de un operón (*rhlAB-R*) a través, de un efecto polar. También, la alta conservación de este ARNT entre las diferentes cepas de *P. aeruginosa*, demuestra su importancia biológica para esta bacteria, capaz de establecer infecciones en una gran variedad de hospederos. Así, la expresión del regulón RhlR, dependiente de la temperatura, agrega un nivel de control en ambientes donde la expresión plena de los factores de virulencia, podrían constituir una desventaja para este patógeno.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pace NR (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 139-144
2. Green SK, Schroth MN, Cho JJ, Kominos SK, Vitanza-Jack VB (1974) Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.* 28: 987–991
3. Dantas G, Sommer MO, Oluwasegun R, Church GM (2008) Bacteria subsisting on antibiotics. *Science* 320:100-103
4. Rahme LG, Tan MW, Le L, Wong SM, Tompkins RG, Calderwood SB, Ausubel FM (1997) Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13245-13250
5. D'Argenio DA, Gallegher LA, Berg CA, Manoil C (2002) *Drosophila* as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol* 183: 1466-1471
6. Tan MW, Ausubel FM (2000) *Caenorabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 3: 29-34
7. Clatworthy AE, Lee JS, Leibman M, Kostun Z, Davidson AJ, Hung DT (2009) *Pseudomonas aeruginosa* infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants. *Infect Immun.* 77:1293-303
8. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Drugs* 67:351-368
9. Manfredi R, Nanetti A, Ferri M, Chiodo F (2000) *Pseudomonas* spp. complications in patients with HIV disease: an eight-year clinical and microbiological survey. *Eur J Epidemiol* 16: 111–118
10. Vento S, Cainelli F, Temesgen Z (2008) Lung infections after cancer chemotherapy. *Lancet Oncol* 9: 982–992
11. Collin BA, Leather HL, Wingard JR, Ramphal R (2001) Evolution, incidence, and susceptibility of bacterial bloodstream isolates from 519 bone marrow transplant patients. *Clin Infect Dis* 33: 947–953
12. Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R (2004) National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4606–4610
13. Bouza E, Burillo A, Munoz P (2002) Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clin Microbiol Infect* 8: 265–274
14. Davis PB (2001) Cystic Fibrosis. *Pediatr Rev* 2: 257–64

15. Davies JC (2002) *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatr Respir Rev* 3: 128–134
16. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hufnagle WO, Kowalk DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrock-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK-S, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saler MH, Hancock REW, Lory S, Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959-964
17. Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG, Ausubel FM (1995) Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268:1899-1902.
18. Ozer EA, Allen JP, Hauser AR (2014) Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. *BMC Genomics* 15:737
19. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR (2010) The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:621-641
20. Ramos JL (2004) *Pseudomonas* Volume 2: Virulence and Gene Regulation. New York: Kluwer Academics/Plenum Publishers.
21. Strateva T, Mitov I (2011) Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of Microbiology* 61: 717-732
22. Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, Prince A (1998) Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* 66: 43–51
23. Mattick JS (2002) Type IV pili and twitching motility. *Ann Rev Microbiol* 56: 289-314
24. Craig L, Pique ME, Tainer JA (2004) Type 4 pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2: 363–378
25. Sriramulu DD, Lünsdorf H, Lam JS, Römling U (2005) Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol* 54: 667–676
26. DeVries CA, Ohman DE (1994) Mucoïd-to-nonmucoïd conversion in alginate-producing *Pseudomonas aeruginosa* often results from spontaneous mutations in *algT*, encoding a putative alternate sigma factor, and shows evidence for autoregulation. *J Bacteriol* 176: 6677–6687

27. Leid JG, Willson CJ, Shirliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, Jeffers AK (2005) The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- γ -mediated macrophage killing. *J Immunol* 175:7512–7518
28. Wozniak JD, Wyckoff T, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole JA, Parsek MR (2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 7907–7912
29. Wieland CW, Siegmund B, Senaldi G, Vasil ML, Dinarello CA, Fantuzzi G (2002) Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin a: Role of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* 70:1352–8
30. Garber NV, Guempel U, Gilboa-Garber N, Doyle RJ (1987) Specificity of the fucose-binding lectin of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 48:331–334
31. Tielker DI, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, Rosenau F, Jaeger KE (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* 151:1313–1323
32. Lau GW, Hassett DJ, Britigan BE (2005) Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Microbiol* 13: 389–397
33. Laughlin RS, Musch MW, Hollbrook CJ, Rocha FM, Chang EB, Alverdy JC (2000) The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis. *Ann Surg* 232:133–142
34. Sonawane AI, Jyot J, Ramphal R (2006) *Pseudomonas aeruginosa* LecB is involved in pilus biogenesis and protease IV activity but not in adhesion to respiratory mucins. *Infect Immun* 74:7035–7039
35. Mewe MI, Tielker D, Schönberg R, Schachner M, Jaeger KE, Schumacher U (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectins I and II and their interaction with human airway cilia. *J Laryngol Otol* 119:595–9
36. Durand EI, Verger D, Rêgo AT, Chandran V, Meng G, Fronzes R, Waksman G (2009). Structural biology of bacterial secretion systems in gram-negative pathogens potential for new drug targets. *Infect Disord Drug Targets* 9: 518–547
37. Bleves SI, Viarre V, Salacha R, Michel GP, Filloux A, Voulhoux R (2010) Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol* 300:534–43
38. Chen L, Zou Y, She P, Wu Y (2015) Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Res* 172: 19–25

39. Guzzo J, Pages JM, Duong F, Lazdunski A, Murgier M (1991) *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J Bacteriol* 173:5290–5297
40. Duong F, Bonnet E, Geli V, Lazdunski A, Murgier M, Filloux A (2001) The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene* 262:147–153
41. Hong YQ1, Ghebrehiwet B (1992) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin Immunol Immunopathol* 62:133-8
42. Létoffé S, Redeker V, Wandersman C (1998) Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Mol Microbiol* 28:1223-1234
43. Filloux A (2004) The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* 1694: 163–179
44. Ball G, Durand E, Lazdunski A, Filloux A (2002) A novel type II secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 43:475–485
45. Pavlovskis OR, Iglewski BH, Pollack M (1978) Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxina in experimental mouse infections: Adenosine diphosphate ribosylation of elongation factor 2. *Infect Immun* 19:29–33
46. Jaffar-Bandjee MCI, Lazdunski A, Bally M, Carrère J, Chazalette JP, Galabert C (1995) Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 33:924-9
47. Schultz MJ1, Rijneveld AW, Florquin S, Speelman P, Van Deventer SJ, van der Poll T (2001) Impairment of host defence by exotoxin a in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice. *J Med Microbiol* 50: 822–7
48. Kessler E, Safrin M, Abrams WR, Rosenbloom J, Ohman DE (1997) Inhibitors and Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *J Biol Chem* 272:9884-9889
49. Wolz C, Hellstern E, Haug M, Galloway DR, Vasil ML, Doring G (1991) *Pseudomonas aeruginosa* LasB mutant constructed by insertional mutagenesis reveals elastolytic activity due to alkaline proteinase and the LasA fragment. *Mol Microbiol* 5:2125-2131
50. Kessler E, Safrin M, Olson JC, Ohman DE (1993) Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *J Biol Chem* 268:7503-7508

51. Schultz DR, Miller KD (1974) Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement components and complement derived chemotactic and phagocytic factors. *Infect Immun* 10: 128-135
52. Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM, Wright JR (2003) *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 528-537
53. Kuang Z, Hao Y, Walling BE, Jeffries JL, Ohman DE, Lau GW (2011) *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. *PLoS One* 6: e27091
54. Meyers DJI, Palmer KC, Bale LA, Kernacki K, Preston M, Brown T, Berk RS (1992) In vivo and in vitro toxicity of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxicon* 30:161-169
55. Jander G, Rahme LG and Ausubel FM (2000) Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol* 182: 3843-3845.
56. Terada LS, Johansen KA, Nowbar S, Vasil AI, Vasil ML (1999) *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun* 67: 2371-2376
57. Ostroff, RM, Wretling B and Vasil ML (1989) Mutations in the hemolytic-phospholipase C operon result in decreased virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 grown under phosphate-limiting conditions. *Infect Immun* 57: 1369-1373
58. Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan RJ (1998) Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 273: 16792-16797
59. Malloy JL, Veldhuizen RA, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ, Wright JR (2005) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L409-418
60. Wilderman PJ, Vasil AI, Johnson Z, Wilson MJ, Cunliffe HE, Lamont IL, Vasil ML (2001) Characterization of an endoprotease (PrpL) encoded by a PvdS-regulated gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 69:5385-5394
61. König B, Jaeger KE, Sage AE, Vasil ML, and König W (1996) Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes). *Infect Immun* 8:3252-3258
62. Cornelis GR. The type III secretion injectisome. (2010) *Nat Rev Microbiol* 4: 811-825

63. Lee VT, Smith RS, Tümmler B, Lory S (2005) Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun* 3:1695-1705
64. Wolfgang MC, Kulasekara BR, Liang X, Boyd D, Wu K, Yang Q, Miyada CG, Lory S (2003) Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8484-8489
65. Roy PH, Tetu SG, Larouche A, Elbourne L, Tremblay S, Ren Q, Dodson R, Harkins D, Shay R, Watkins K, Mahamoud Y, Paulsen IT (2010) Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS ONE* 5:e8842
66. Barbieri JT, Sun J (2004) *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 152:79-92
67. Sato H, Frank DW (2004) ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol Microbiol* 53:1279-1290
68. Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, Barbieri JT, Frank DW (1998) ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13899-13904
69. Cowell BA, Evans DJ, Fleiszig SM (2005) Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *FEMS Microbiol Lett* 250: 71-76
70. Abdel-Mawgoud AMI, Lépine F, Déziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1323-36
71. Kownatzki R, Tümmler B, Döring G (1987) Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* 1: 1026-1027
72. Zulianello L, Canard C, Kohler T, Caille D, Lacroix JS, Meda P. (2006) Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 74:3134-47
73. Jensen PØ, Bjarnsholt T, Phipps R, Rasmussen TB, Calum H, Christoffersen L, Moser C, Williams P, Pressler T, Givskov M, Høiby N (2007) Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153:1329-38
74. Van Gennip M, Christensen LD, Alhede M, Phipps R, Jensen PØ, Christophersen L, Pamp SJ, Moser C, Mikkelsen PJ, Koh AY, Tolker-Nielsen T, Pier GB, Høiby N, Givskov M, Bjarnsholt T (2009) Inactivation of the *rhlA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *APMIS* 117:537-46

75. Lau GWI, Hassett DJ, Ran H, Kong F (2004) The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 10:599-606
76. Denning GMI, Iyer SS, Reszka KJ, O'Malley Y, Rasmussen GT, Britigan BE (2003) Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L584-L592
77. O'Malley YQ, Reszka KJ, Spitz DR, Denning GM, Britigan BE. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L94-L103
78. Otto BR, Verweij-van Vudht AM, MacLaren DM (1992) Transferrin and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit Rev Microbiol* 18:217-233
79. Clément E, Mesini PJ, Pattus F, Schalk IJ (2004) The binding mechanism of pyoverdine with the outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on its iron-loaded status. *Biochemistry* 43: 7954-7965
80. Shirley M, Lamont IL (2009) Role of TonB1 in pyoverdine-mediated signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 191: 5634-5640
81. Cornelis P (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86:1637-1645
82. Cornelis P, Dingemans J (2013) *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol* 3:75
83. Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML (2002) Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7072-7077
84. Banin E, Vasil ML, Greenberg EP (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11076-11081
85. Gallagher LA, Manoil C (2001) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J Bacteriol* 183: 6207-6214
86. Blumer C, Haas D (2000) Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch Microbiol* 173:170-177
87. Stutz MDI, Gangell CL, Berry LJ, Garratt LW, Sheil B, Sly PD; Australian Respiratory Early Surveillance Team for Cystic Fibrosis (2011) Cyanide in bronchoalveolar lavage is not diagnostic for *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *Eur Respir J* 37: 553-558

88. McVittie A, Zahler SA, Messik F (1962) Developmental biology of *Myxococcus*. *J Bacteriol* 84:546-551
89. Tomasz B (1965) Control of the competence state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for the new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature* 208:155-159
90. Nealson KH, Platt T, Hasting JW (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104:313-322
91. Gonzalez JE, Marketon MM (2003) Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:574-592
92. Parsek MR, Greenberg EP (2000) Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8789-8793
93. Daniels RI, Vanderleyden J, Michiels J (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 28:261-89
94. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilms. *Science* 280:295-298
95. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176:269-275
96. Case RJ, Labbate M, Kjelleberg S (2008) AHL-driven quorum-sensing circuits: their frequency and function among the Proteobacteria. *Isme J* 2:345-349
97. Nealson KH (1977) Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. *Arch Microbiol* 112:73-79
98. Ruby EG (1996) Lessons from a cooperative bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organs symbiosis. *Ann Rev Microbiol* 50:591-624
99. Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP (2001) Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Ann Rev Genet* 35:439-468
100. Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH, Oppenheimer NJ (1981) Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* 20:2444-2449
101. Engebrecht J, Silverman M (1984) Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:4154-4158

102. Choi SH, Greenberg EP (1992) Genetic dissection of DNA binding and luminescence gene activation by the *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J Bacteriol* 174:4064-4069
103. Kaplan HB, Greenberg EP (1985) Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* 163:1210-1214
104. Devine JHI, Shadel GS, Baldwin TO (1989) Identification of the operator of the *lux* regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5688-5692
105. Eglund KA, Greenberg EP (1999) Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. *Mol Microbiol* 31:1197-1204
106. Engebrecht J, Neelson K, Silverman M (1983) Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. *Cell* 2:773-781
107. Shadel GS, Baldwin TO (1992) Identification of a distantly located regulatory element in the *luxD* gene required for negative autoregulation of the *Vibrio fischeri luxR* gene. *J Biol Chem* 267:7690-7695
108. Schuster M, Lostroh CP, Ogi T, Greenberg EP (2003) Identification, timing and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* 185: 2066-2079
109. Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH (2003) Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* 185: 2080-2095
110. Ochsner UA, Reiser J (1995) Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 92: 6424-6428
111. Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH (1997) Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179: 3127-3132
112. Pesci EC, Millbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH (1999) Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11229-34
113. Whiteley M, Greenberg EP (2001) Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J Bacteriol* 183: 5529-5534
114. Medina G, Juárez K, Díaz R, Soberón-Chávez G (2003) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 149:3073-3081

115. Ventre I, Ledgham F, Prima V, Lazdunski A, Foglino M, Sturgis JN (2003) Dimerization of the quorum sensing regulator RhlR: development of a method using EGFP fluorescence anisotropy. *Mol Microbiol* 48 :187-198
116. Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9839-9843
117. Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21: 1137-1146
118. Van Delden C, Pesci EC, Pearson JP, Iglewski BH (1998) Starvation selection restores elastase and rhamnolipid production in a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutant. *Infect Immun* 66: 4499-502
119. Dekimpe V, Déziel E (2009) Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155: 712-23
120. Lee J, Wu J, Deng Y, Wang J, Wang C, Wang J, Chang C, Dong Y, Williams P, Zhang LH (2013) A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol* 9: 339-343
121. Jensen V, Löns D, Zaoui C, Bredenbruch F, Meissner A, Dieterich G, Münch R, Häussler S (2006) RhlR expression in *Pseudomonas aeruginosa* is modulated by the *Pseudomonas* quinolone signal via PhoB-dependent and independent pathways. *J Bacteriol* 188: 8601-8606
122. Seed PC, Passador L, Iglewski BH (1995) Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* *lasI* gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol* 177:654-659
123. de Kievit TR, Kakai Y, Register JK, Pesci EC, Iglewski BH (2002) Role of the *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in *rhlI* regulation. *FEMS Microbiol Lett* 212:101-106
124. Brint JM, Ohman DE (1995) Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under control of RhlR-RhlI, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J Bacteriol* 177: 7155-7163
125. Latifi A, Winson MK, Foglino M, Bycroft BW, Stewart GS, Lazdunski A, Williams P (1995). Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* 17: 3333-3343

126. Toder DS, Ferrell SJ, Nezezon JL, Rust L, Iglewski BH (1994) *lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity. *Infect Immun* 62:1320-1327
127. Gambello MJ, Kaye S, Iglewski BH (1993) LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect Immun* 61:1180-1184
128. Ochsner UA, Fiechter A, Reiser J (1994) Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem* 269: 19787-19795
129. Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH (1997) Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis. *J Bacteriol* 179: 5756-5767
130. Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS, 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
131. Winzer K, Falconer C, Garber NC, Diggle SP, Camara M, Williams P (2000) The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-II and PA-III are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* 182:6401-6411
132. Pessi G, Haas D (2000) Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182: 6940-6949
133. Cao H, Krishnan G, Goumnerov B, Tsongalis J, Tompkins R, Rahme LG (2001) A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14613-14618
134. Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC, Manoil C (2002) Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184: 6472-80
135. Xiao G, He J, Rahme LG (2006) Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology* 152: 1679-1686

136. McGrath S, Wade DS, Pesci EC (2004) Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol Lett* 230: 27-34
137. D'Argenio DA, Calfee MW, Rainey PB, Pesci EC (2002) Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J Bacteriol* 184:6481-6489
138. Farrow JM 3rd, Sund ZM, Ellison ML, Wade DS, Coleman JP, Pesci EC (2008) PqsE functions independently of PqsR-*Pseudomonas* quinolone signal and enhances the *rhl* quorum-sensing system. *J Bacteriol* 190: 7043-7051
139. Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Cámara M, Williams P (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates *rhl*-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* 50: 29-43
140. Collier DN, Anderson L, McKnight SL, Noah TL, Knowles M, Boucher R, Schwab U, Gilligan P, Pesci EC (2002) A bacterial cell to cell signal in the lungs of cystic fibrosis patients. *FEMS Microbiol Lett* 215: 41-46
141. Hoffman LR, Kulasekara HD, Emerson J, Houston LS, Burns JL, Ramsey BW, Miller SI (2009) *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J Cyst Fibros* 8:66-70
142. Long J, Zaborina O, Holbrook C, Zaborin A, Alverdy J (2008) Depletion of intestinal phosphate after operative injury activates the virulence of *P. aeruginosa* causing lethal gut-derived sepsis. *Surgery* 144:189-197
143. Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, Williams P, Cámara M (2002) Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* 184:2576-2586
144. Siehnel R, Traxler B, An DD, Parsek MR, Schaefer AL, Singh PK (2010) A unique regulator controls the activation threshold of quorum-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 7916-7921
145. Schuster M, Greenberg EP (2007) Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC Genomics* 8:287
146. 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
147. Rampioni G, Bertani I, Zennaro E, Polticelli F, Venturi V, Leoni L (2006) The quorum-sensing negative regulator RsaL of *Pseudomonas aeruginosa* binds to the *lasI* promoter. *J Bacteriol* 188:815-819

148. Rampioni G, Schuster M, Greenberg EP, Bertani I, Grasso M, Venturi V, Zennaro E, Leoni L (2007) RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 66:1557-1565
149. Albus AM, Pesci EC, Runyen-Janecky LJ, West SE, Iglewski BH (1997) Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179:3928-3935
150. Beatson SA, Whitchurch CB, Sargent JL, Levesque RC, Mattick JS (2002) Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184:3605-3613
151. Fuchs EL, Brutinel ED, Jones AK, Fulcher NB, Urbanowski ML, Yahr TL, Wolfgang MC (2010) The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *J Bacteriol* 192:3553-3564
152. Dasgupta N, Ferrell EP, Kanack KJ, West SE, Ramphal R (2002) *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is σ^{70} dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* 184:5240-50
153. Kanack KJ, Runyen-Janecky LJ, Ferrell EP, Suh SJ, West SE (2006) Characterization of DNA-binding specificity and analysis of binding sites of the *Pseudomonas aeruginosa* global regulator, Vfr, a homologue of the *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Microbiology* 152:3485-3496
154. Croda-García G, Grosso-Becerra V, Gonzalez-Valdez 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
155. Whiteley M, Parsek MR, Greenberg EP (2000) Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182:4356-4360
156. Schuster M, Hawkins AC, Harwood CS, Greenberg EP (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol* 51:973-985
157. Sio CF, Otten LG, Cool RH, Diggie SP, Braun PG, Bos R, Daykin M, Cámara M, Williams P, Quax WJ (2006) Quorum quenching by an N-acyl-homoserine lactone acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Immun* 74:1673-1682
158. Huang JJ, Petersen A, Whiteley M, Leadbetter JR (2006) Identification of QuiP, the product of gene PAI032, as the second acyl-homoserine lactone acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* 72:1190-1197

159. Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, D'Argenio D, Manoil C, Greenberg EP (2001) QscR, a modulator of quorum sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2752-2757
160. Ledgham F, Ventre I, Soscia C, Foglino M, Sturgis JN, Lazdunski A (2003) Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol Microbiol* 48: 199-210
161. Juhas M, Wiehlmann L, Huber B, Jordan D, Lauber J, Salunkhe P, Limpert AS, von Götze F, Steinmetz I, Eberl L, Tümmler B (2004) Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 150:831-841
162. Li LL, Malone JE, Iglewski BH (2007) Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. *J Bacteriol* 189:4367-4374
163. Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra SR, Sockett RE, Goldner M, Dessaux Y, Cámara M, Smith H, Williams P (2002) N-Acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 70: 5635-5646
164. Boyer M, Wisniewski-Dyé F (2009) Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiol Ecol* 70:1-19
165. Seet QL, Zhang LH (2011) Anti-activator QslA defines the quorum sensing threshold and response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 80:951-965
166. Gilbert KB, Kim TH, Gupta R, Greenberg EP, Schuster M (2009). Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Mol Microbiol* 73: 1072-1085
167. Luo ZQ, Qin Y, Farrand SK (2000) The antiactivator TraM interferes with the autoinducer-dependent binding of TraR to DNA by interacting with the C-terminal region of the quorum-sensing activator. *J Biol Chem* 275:7713-7722.
168. Bondi R, Messina M, De Fino I, Bragonzi A, Rampioni G, Leoni L (2014) Affecting *Pseudomonas aeruginosa* phenotypic plasticity by quorum sensing dysregulation hampers pathogenicity in murine chronic lung infection. *PLoS One* 9:e112105.
169. Gupta R, Schuster M (2013) Negative regulation of bacterial quorum sensing tunes public goods cooperation. *ISME J* 7:2159-2168
170. Fan H, Dong Y, Wu D, Bowler MW, Zhang L, Song H (2010) QsIA disrupts LasR dimerization in antiactivation of bacterial quorum sensing. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:20765-20770

171. Reimmann C, Beyeler M, Latifi A, Winteler H, Foglino M, Lazdunski A, Haas D (1997) The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol* 2:309-319
172. Heurlier K, Williams F, Heeb S, Dormond C, Pessi G, Singer D, Cámara M, Williams P, Haas D (2004) Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 186:2936-2945
173. Zaborin A, Romanowski K, Gerdes S, Holbrook C, Lepine F, Long J, Poroyko V, Diggle SP, Wilke A, Righetti K, Morozova I, Babrowski T, Liu DC, Zaborina O, Alverdy JC (2009) Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:6327-6332
174. Hendrickson EL, Plotnikova J, Mahajan-Miklos S, Rahme LG, Ausubel FM (2001) Differential roles of the *Pseudomonas aeruginosa* PA14 rpoN gene in pathogenicity in plants, nematodes, insects, and mice. *J Bacteriol* 183:7126-7134
175. Heurlier K, Déneraud V, Pessi G, Reimmann C, Haas D (2003) Negative control of quorum sensing by RpoN (σ^{54}) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 185:2227-2235
176. van Delden C, Comte R, Bally AM (2001) Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183:5376-5384
177. Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, Williams P, Cámara M (2002) Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* 184:2576-2586
178. Li C, Wally H, Miller SJ, Lu CD (2009) The multifaceted proteins MvaT and MvaU, members of the H-NS family, control arginine metabolism, pyocyanin synthesis, and prophage activation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 191:6211-6218
179. Pessi G, Williams F, Hindle Z, Heurlier K, Holden MT, Cámara M, Haas D, Williams P (2001) The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183:6676-6683.
180. Jude F, Köhler T, Branny P, Perron K, Mayer MP, Comte R, van Delden C (2003) Posttranscriptional control of quorum-sensing-dependent virulence genes by DksA in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185:3558-3566
181. Mahan M J, Slauch J M, Mekalanos J J (1996) Environmental regulation of virulence gene expression in *Escherichia*, *Salmonella* and *Shigella* spp. In *Escherichia coli* and *Salmonella*:

cellular and molecular biology. Neidhardt F C, Curtiss III R, Ingraham J L, Lin E C C, Low K B, Magasanik B, Reznikoff W S, Riley M, Schaechter M, Umberger H E, editors. 2nd ed. Washington, D.C: ASM Press. pp. 1075-1090

182. Mekalanos JJ (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 174:1-7
183. Chowdhury R, Sahu GK, Das J (1996) Stress response in pathogenic bacteria. *J Biosci* 21:149-160
184. Hurme R, Rhen M (1998) Temperature sensing in bacterial gene regulation-- what it all boils down to. *Mol Microbiol* 30:1-6
185. Konkel ME, Tilly K (2000) Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. *Microbes Infect* 2:1557-166
186. Schumann W (2012) Thermosensor systems in eubacteria. *Adv Exp Med Biol* 739:1-16
187. Dorman CJ (1996) Flexible response: DNA supercoiling, transcription and bacterial adaptation to environmental stress. *Trends Microbiol* 4:214-216
188. López-García P, Forterre P (1997) DNA topology in hyperthermophilic archaea: reference states and their variation with growth phase, growth temperature, and temperature stresses. *Mol Microbiol* 23:1267-1279
189. Dorman CJ, Corcoran CP (2009) Bacterial DNA topology and infectious disease. *Nucleic Acids Res* 37:672- 678
190. Nickerson CA, Achberger EC (1995) Role of curved DNA in binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to promoters. *J Bacteriol* 177: 5756-5761
191. Katayama S, Matsushita O, Jung CM, Minami J, Okabe A (1999) Promoter upstream bent DNA activates the transcription of the *Clostridium perfringens* phospholipase C gene in a low temperature-dependent manner. *EMBO J* 18:3442-3450
192. Los DA (2004) The effect of low-temperature-induced DNA supercoiling on the expression of the desaturase genes in *Synechocystis*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 50:605-612
193. Dorman CJ (2004) H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev microbiol* 2:391-400
194. Ono S, Goldberg MD, Olsson T, Esposito D, Hinton JC, Ladbury JE (2005) H-NS is a part of a thermally controlled mechanism for bacterial gene regulation. *Biochem J* 391:203-213

195. Göransson M, Sondén B, Nilsson P, Dagberg B, Forsman K, Emanuelsson K, Uhlin, BE (1990) Transcriptional silencing and thermoregulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Nature* 344: 682-685
196. Duong N, Osborne S, Bustamante VH, Tomljenovic AM, Puente JL, Coombes BK (2007) Thermosensing coordinates a cis-regulatory module for transcriptional activation of the intracellular virulence system in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Biol Chem* 282:34077-34084
197. Falconi M, Colonna B, Prosseda G, Micheli G, Gualerzi CO (1998) Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. *EMBO J* 17: 7033-7043
198. Prosseda G, Falconi M, Giangrossi M, Gualerzi CO, Micheli G, Colonna B (2004) The *virF* promoter in *Shigella*: more than just a curved DNA stretch. *Mol Microbiol* 51:523-37
199. Hurme R, Berndt KD, Normark SJ, Rhen M (1997) A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*. *Cell* 90:55-64
200. Herbst K, Bujara M, Heroven AK, Optiz W, Weichert M, Zimmermann A, Dersch P (2009) Intrinsic thermal sensing controls proteolysis of *Yersinia* virulence regulator RovA. *PLoS Pathog* 5:e1000435
201. Jackson MW, Silva-Herzog E, Plano GV (2004) The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the *Yersinia pestis* type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein. *Mol Microbiol* 54:1364-1378
202. Kamp HD, Higgins DE (2011) A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 7:e1002153
203. Chakraborty S, Li M, Chatterjee C, Sivaraman J, Leung KY, Mok YK (2010) Temperature and Mg²⁺ sensing by a novel PhoP-PhoQ two-component system for regulation of virulence in *Edwardsiella tarda*. *J Biol Chem* 285:38876-38888
204. Servant P, Grandvalet C, Mazodier P (2000) The RheA repressor is the thermosensor of the HSP18 heat shock response in *Streptomyces albus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3538-3543
205. Peel M, Donachie W, Shaw A (1988) Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J Gen Microbiol* 134:2171-2178

206. Heroven AK, Böhme K, Tran-Winkler H, Dersch P (2007) Regulatory elements implicated in the environmental control of invasins expression in enteropathogenic *Yersinia*. *Adv Exp Med Biol* 603:156-66
207. Narberhaus F, Vogel J (2009) Regulatory RNAs in prokaryotes: here, there and everywhere. *Mol Microbiol* 74: 261-269
208. Waters LS, Storz G (2009) Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* 136: 615-628
209. Caldelari IL, Chao Y, Romby P, Vogel J (2013) RNA-mediated regulation in pathogenic bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a010298
210. Narberhaus F (2010) Translational control of bacterial heat shock and virulence genes by temperature-sensing mRNAs. *RNA Biol* 7:84-89
211. Henkin TM (2008) Riboswitch RNAs: using RNA to sense cellular metabolism. *Genes Dev* 22:3383-3390
212. Storz G, Altuvia S, Wassarman KM (2005) An abundance of RNA regulators. *Annu Rev Biochem* 74: 199-217
213. Gottesman S, Storz G (2011) Bacterial small RNA regulators: Versatile roles and rapidly evolving variations. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a003798
214. Narberhaus F, Waldminghaus T, Chowdhury S (2006) RNA thermometers. *FEMS Microbiol Rev* 30:3-16
215. Morita MT, Tanaka Y, Kodama TS, Kyogoku Y, Yanagi H, Yura T (1999) Translational induction of heat shock transcription factor σ^{32} : Evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev* 13, 655-665
216. Nocker A, Hausherr T, Balsiger S, Krstulovic NP, Hennecke H, Narberhaus F (2001) A mRNA-based thermosensor controls expression of rhizobial heat shock genes. *Nucleic Acids Res* 29:4800-4807
217. Altuvia S, Kornitzer D, Teff D, Oppenheim AB (1989) Alternative mRNA structures of the cIII gene of bacteriophage λ determine the rate of its translation initiation. *J Mol Biol* 210:265-280
218. Giuliadori AM, Di Pietro F, Marzi S, Masquida B, Wagner R, Romby P, Gualerzi CO, Pon CL (2010) The *cspA* mRNA is a thermosensor that modulates translation of the cold-shock protein CspA. *Mol Cell* 37:21-33
219. Waldminghaus T, Heidrich N, Brantl S, Narberhaus F (2007) FourU: a novel type of RNA thermometer in *Salmonella*. *Mol Microbiol* 65:413-424

220. Johansson J, Mandin P, Renzoni A, Chiaruttini C, Springer M, Cossart P (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110:551-561
221. Loh E, Kugelberg E, Tracy A, Zhang Q, Gollan B, Ewles H, Chalmers R, Pelicic V, Tang CM (2013) Temperature triggers immune evasion by *Neisseria meningitidis*. *Nature* 502:237-244
222. Matsunaga J, Schlax PJ, Haake DA (2013) Role for cis-acting RNA sequences in the temperature-dependent expression of the multiadhesive Lig proteins in *Leptospira interrogans*. *J Bacteriol* 195:5092-5110
223. Weber GG, Kortmann J, Narberhaus F, Klose KE (2014) RNA thermometer controls temperature-dependent virulence factor expression in *Vibrio cholera*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111:14241-14246
224. Kortmann J, Narberhaus F (2012) Bacterial RNA thermometers: molecular zippers and switches. *Nat Rev Microbiol* 10:255-265
225. Rinnenthal JI, Klinkert B, Narberhaus F, Schwalbe H (2011) Modulation of the stability of the *Salmonella* fourU-type RNA thermometer. *Nucleic Acids Res* 39:8258-70
226. Chowdhury S, Ragaz C, Kreuger E, Narberhaus F (2003) Temperature-controlled structural alterations of an RNA thermometer. *J Biol Chem* 278: 47915-47921.
227. Morita M, Kanemori M, Yanagi H, Yura T (1999) Heat-induced synthesis of σ^{32} in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure. *J Bacteriol* 181:401-410
228. Morita MT, Tanaka Y, Kodama TS, Kyogoku Y, Yanagi H, Yura T (1999) Translational induction of heat shock transcription factor σ^{32} : evidence for a built-in RNA thermosensor. *Genes Dev* 13: 655-665
229. Waldminghaus T, Gaubig LC, Klinkert B, Narberhaus F (2009) The *Escherichia coli* *ibpA* thermometer is comprised of stable and unstable structural elements. *RNA Biol* 6: 455-463
230. Yura T, Nagai H, Mori H (1993) Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 47:321-50
231. Lim B, Gross CA (2011) Cellular Response to Heat Shock and Cold Shock. In *Bacterial Stress Responses*. Storz G, Hengge R (eds). Second Edition. Washington, D.C.: ASM Press, pp 93-114
232. Narberhaus F, Käser R, Nocker A, Hennecke H (1998). A novel DNA element that controls bacterial heat shock gene expression. *Mol Microbiol* 28, 315-323

233. Waldminghaus T, Fippinger A, Alfsmann J, Narberhaus F (2005) RNA thermometers are common in α - and γ -proteobacteria. *Biol Chem* 386:1279-1286
234. Chowdhury S, Maris C, Allain FH, Narberhaus F (2006) Molecular basis for temperature sensing by an RNA thermometer. *EMBO J* 25: 2487-2497
235. Krajewski SS, Nagel M, Narberhaus F (2013) Short ROSE-like RNA thermometers control *IbpA* synthesis in *Pseudomonas* species. *PLoS One* 8:e65168.
236. Böhme K, Steinmann R, Kortmann J, Seekircher S, Heroven AK, Berger E, Pisano F, Thiermann T, Wolf-Watz H, Narberhaus F, Dersch P (2012) Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control *Yersinia* virulence. *PLoS Pathog* 8:e1002518
237. Klinkert B, Cimdins A, Gaubig LC, Roßmanith J, Aschke-Sonnenborn U, Narberhaus F (2012) Thermogenetic tools to monitor temperature-dependent gene expression in bacteria. *J Biotechnol* 160:55-63
238. Lipinska B, Fayet O, Baird L, Georgopoulos C (1989) Identification, characterization, and mapping of the *Escherichia coli htrA* gene, whose product is essential for bacterial growth only at elevated temperatures. *J Bacteriol* 171:1574-1584
239. Krajewski SS, Joswig M, Nagel M, Narberhaus F (2014) A tricistronic heat shock operon is important for stress tolerance of *Pseudomonas putida* and conserved in many environmental bacteria. *Environ Microbiol* 16:1835-1853
240. Cimdins A, Roßmanith J, Langklotz S, Bandow JE, Narberhaus F (2013) Differential control of *Salmonella* heat shock operons by structured mRNAs. *Mol Microbiol* 89:715-731
241. Kortmann J, Sczodrok S, Rinnenthal J, Schwalbe H, Narberhaus F (2011) Translation on demand by a simple RNA-based thermosensor. *Nucleic Acids Res* 39:2855-2868
242. Yamanaka K, Mitta M, Inouye M (1999) Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock *cspA* mRNA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 181:6284-6291
243. Hoe NP, Goguen JD (1993) Temperature sensing in *Yersinia pestis*: translation of the LcrF activator protein is thermally regulated. *J Bacteriol* 175: 7901-7909
244. Böhme K, Steinmann R, Kortmann J, Seekircher S, Heroven AK, Berger E, Pisano F, Thiermann T, Wolf-Watz H, Narberhaus F, Dersch P (2012) Concerted actions of a thermo-labile regulator and a unique intergenic RNA thermosensor control *Yersinia* virulence. *PLoS Pathog* 8:e1002518

245. Johansson J, Mandin P, Renzoni A, Chiaruttini C, Springer M, Cossart P (2002) An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110: 551-561
246. Loh E, Dussurget O, Gripenland J, Vaitkevicius K, Tiensuu T, Mandin P, Repoila F, Buchrieser C, Cossart P, Johansson J (2009) A trans-acting riboswitch controls expression of the virulence regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 139: 770-779
247. Kouse AB, Righetti F, Kortmann J, Narberhaus F, Murphy ER (2013) RNA-mediated thermoregulation of iron-acquisition genes in *Shigella dysenteriae* and pathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One* 8:e63781
248. Kropinski AM, Lewis V, Berry D (1987) Effect of growth temperature on the lipids, outer membrane proteins and lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J Bacteriol* 169:1960-1966
249. Lafontaine ER, Sokol PA (1998) Effects of Iron and temperature on expression of the *Pseudomonas aeruginosa* *tolQRA* genes: role of the ferric uptake regulator. *J Bacteriol* 180: 2836-2841
250. Jaouen T, Dé E, Chevalier S, Orange N (2004) Pore size dependence on growth temperature is a common characteristic of the major outer membrane protein OprF in psychrotrophic and mesophilic *Pseudomonas* species. *Appl Environ Microb* 70:6665-6669
251. Termine E, Michel GP (2009) Transcriptome and secretome analyses of the adaptive response of *Pseudomonas aeruginosa* to suboptimal growth temperature. *Int Microbiol* 12:7-12
252. Huang J, Xu Y, Zhang H, Li Y, Huang X, Ren B, X Zhang (2009) Temperature-dependent expression of *phzM* and its regulatory genes *lasI* and *ptsP* in rhizosphere isolate *Pseudomonas* sp. Strain M18. *Appl Environ Microb* 75:6568-6580
253. Wu DQ, Ye J, Ou HY, Wei X, Huang X, He YW, Xu Y (2011) Genomic analysis and temperature-dependent transcriptome profiles of the rhizosphere originating strain *Pseudomonas aeruginosa* M18. *BMC genomics* 12:438
254. Wurtzel O, Yoder-Himes DR, Han K, Dandekar AA, Edelheit S, Greenberg EP, Sorek R, Lory S (2012) The single-nucleotide resolution transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* grown in body temperature. *PLoS Pathog* 8:e1002945
255. Wu DQ, Li Y, Xu Y (2012) Comparative analysis of temperature-dependent transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* strains from rhizosphere and human habitats. *Appl Microbiol Biotechnol* 96:1007-1019
256. Barbier M, Damron FH, Bielecki P, Suárez-Diez M, Puchałka J, Albertí S, Dos Santos VM, Goldberg JB (2014) From the environment to the host: re-wiring of the transcriptome of *Pseudomonas aeruginosa* from 22°C to 37°C. *PLoS One* 9:e89941

257. Delvillani F, Sciandrone B, Peano C, Petiti L, Berens C, Georgi C, Ferrara S, Bertoni G, Pasini ME, Dehò G, Briani F (2014) Tet-Trap, a genetic approach to the identification of bacterial RNA thermometers: application to *Pseudomonas aeruginosa*. *RNA* 20:1963-1976
258. Zhang Y, Miller R (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (Biosurfactant) *Appl Environm Microbiol* 58:3276-3282
259. Wenner N, Maes A, Cotado-Sampayo M, Lapouge K (2014) NrsZ: A novel, processed, nitrogen-dependent, small non-coding RNA that regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence. *Environ Microbiol* 16:1053-1068
260. Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31: 3406-3415
261. Waldminghaus T, Gaubig LC, Narberhaus F (2007) Genome-wide bioinformatic prediction and experimental evaluation of potential RNA thermometers. *Mol Genet Genomics* 278: 555-564
262. Serres MH, Kerr AR, McCormack TJ, Riley M (2009) Evolution by leaps: gene duplication in bacteria. *Biol Direct* 4:46