



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

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

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

P R E S E N T A

M. en C. Alejandra Abigail González Valdéz

TUTOR PRINCIPAL:

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Dimitris Georgellis, Instituto de Fisiología, UNAM

Dr. Edgardo Escamilla Marván. Instituto de Fisiología Celular, UNAM[†]

Ciudad de México, junio 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Para María José y Ximena,
mis hermosas hijas.

A todas y todos los que luchan dentro y fuera de las aulas con entusiasmo y tesón;
mis maestros, mis colegas y mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesora, la doctora Gloria Soberón Chávez por sus enseñanzas y su enorme paciencia, por guiarme y darme la oportunidad de formar parte de su obra.

Agradezco a mi comité tutorial: el doctor Dimitris Georgellis y Edgardo Escamilla Marván[†], por sus apreciables comentarios hacia el trabajo.

Al doctor Saúl Gómez Manzo, por haber formado parte en mi crecimiento académico y personal.

Agradezco infinitamente a todos aquellos que de alguna manera han contribuido en la realización directa o indirectamente a este trabajo, aquellos que han pasado y me han dejado una enseñanza: a mis padres y hermanos, a mis compañeros de laboratorio, a mis alumnos, a mis amigos, a mis colegas. GRACIAS.

1	RESUMEN.....	3
2	ABSTRACT.....	4
3	LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	5
4	INTRODUCCIÓN.....	7
4.1	Generalidades.....	7
4.2	Genoma de <i>P. aeruginosa</i>	8
4.3	Factores de Virulencia.....	9
4.4	Respuesta sensora de quórum (RSQ).	13
4.5	Respuesta sensora de quórum en <i>Vibrio fischeri</i>	17
4.6	Respuesta sensora de quórum en <i>P. aeruginosa</i>	20
4.7	Sistema LasRI	21
4.8	Sistema RhIRI.....	23
4.9	Sistema PQS.....	24
4.10	Relación entre los sistemas de QS	25
4.11	Familia de activadores transcripcionales LuxR	27
4.12	Regulación Transcripcional por LasR.....	28
4.13	Regulación Transcripcional por RhIR.	29
4.14	Especificidad de las cajas <i>las</i>	30
4.15	Sistemas de Represión.	33
5	ANTECEDENTES.....	34
6	Hipótesis.....	35
7	Objetivo General.....	36
8	Objetivos Específicos.....	36
9	Estrategia experimental.	36

9.1	Construcción de promotor artificial y los cambios 8,11 y 12.....	36
9.2	Construcción del promotor natural de <i>rhIA</i>	39
9.3	MUTAGENESIS SITIO DIRIGIDA.....	40
9.4	Actividad del promotor de <i>rhIA</i> en <i>E. Coli</i> y en <i>P. aeruginosa</i>	40
9.5	EMSA	41
10	RESULTADOS	42
11	DISCUSIÓN GENERAL	42
12	CONCLUSIONES.....	46
13	PERSPECTIVAS	47
14	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47

1 RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria ambiental y un importante patógeno oportunista. Los genes que codifican para los factores de virulencia están regulados a nivel de transcripción por la respuesta de detección de quórum. En esta respuesta, el regulador LasR junto con el autoinductor 3-oxo-dodecanoil homoserina-lactona (3OC12-HSL) activa la transcripción de genes que codifican para factores de virulencia y este mismo complejo activa la transcripción del segundo sistema de regulación de quórum, por activar al segundo regulador transcripcional RhIR, y la sintasa RhII, quien produce el autoinductor de butanoil-homoserina lactona (C4-HSL) que interactúa con RhIR. Los genes activados por RhIR / C4-HSL incluyen aquellos implicados en la producción de ramnolípidos (como el operón rhIAB) y lecA, que codifica la lectina PA-IL; entre otros. La especificidad de unión de estos reguladores al DNA en regiones denominadas cajas *las* no se ha determinado claramente, así que el objetivo de este trabajo es contribuir a su comprensión. Por lo tanto, analizamos la interacción de LasR/3-O-C12-HSL y RhIR/C4-HSL a la caja *las* de rhIA y sus variantes que se construyeron con base en la comparación de la secuencia de esta caja con la caja de lecA. Concluimos que la especificidad de unión a DNA de LasR y RhIR es un fenómeno multifactorial complejo en el que están implicados tanto efectos positivos como negativos, y que la unión de estas proteínas no necesariamente da como resultado la activación de genes.

2 ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an environmental bacterium and an important opportunistic pathogen. The genes coding for virulence-associated traits are regulated at the level of transcription by the quorum-sensing response. In this response the regulator LasR coupled with the autoinducer 3-oxo-dodecanoyl homoserine-lactone (3O-C12-HSL) activates transcription of genes for several virulence-factors. LasR/3O-C12-HSL also activates transcription of the genes coding for a second transcriptional regulator RhIR, and of *rhII*, that encodes for the synthase that produces the autoinducer butanoyl-homoserine lactone (C4-HSL), that interacts with RhIR. Genes activated by RhIR/C4-HSL include those involved in rhamnolipids production (like the *rhIAB* operon) and *lecA*, coding for PA-IL lectin. The molecular basis of LasR/3O-C12-HSL and RhIR/C4-HSL DNA-binding specificity (at the so called las-boxes), has not been clearly determined, and the aim of this work is to contribute to its understanding. Therefore, we analyzed the interaction of LasR and RhIR to variants of the *rhIA* las-box that were constructed based on the comparison of this las-box to the las-box of *lecA*. We conclude that LasR and RhIR DNA-binding specificity is a complex multifactorial phenomenon in which both positive and negative effects are involved, and that binding of these proteins does not necessarily results in gene activation.

3 LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Factores de Virulencia en *P. aeruginosa*. Imagen que muestra los diferentes factores de virulencia que produce *Pseudomonas aeruginosa* y los sistemas de secreción involucrados. Imagen modificada de Stephen P. Diggle 2020.

Figura 2 Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum. Conforme la bacteria se va duplicando, el autoinductor se sintetiza y acumula hasta una cierta concentración y es cuando interactúa con una proteína y juntos regulan la expresión genética de la luz. Modificado de Soberón Chávez 2003.

Figura 3 Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum de *Vibrio fischeri*. A una densidad celular baja, la expresión de *luxI* es basal y los niveles de OHHL dentro y fuera de la célula es también baja; pero cuando aumenta la densidad celular también aumenta OHHL y este se une al regulador LuxR, este complejo promueve la transcripción de *luxI* como también los genes de luciferasa. Modificado de Soberón Chávez 2003.

Figura 4. Representación del sistema LasRI. El regulador LasR se une al autoinductor C12- HSL y juntos activan la expresión de los genes *lasI* y *rsaL* y a su vez RsaL reprime la expresión del gen *lasI*, regulando la expresión del autoinductor.

Figura 5. Representación del sistema RhlRI. El sistema LasRI activa la expresión de RhlR y a la sintasa RhlI que produce el autoinductor C4-HSL y juntos Regulador-Autoinductor activa la expresión el operón de *rhlABR*.

Figura 6. Representación del sistema PQS El sistema LasRI activa la expresión del regulador PqsR y PqsH, este último convierte la molécula de HHQ a PQS, a su vez PQS unido a PqsR activa la expresión del operón *pqsABCDE* responsable de sintetizar HHQ y *phnAB*.

Figura 7. Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum en *P. aeruginosa*. García-Reyes, S *et. al.* 2020. *P. aeruginosa* tiene 3 sistemas dependientes de la densidad celular, dos de ellos son dependientes de moléculas tipo homoserin lactona y otra de naturaleza de quinolona. El primer sistema LasRI encabeza la cascada de regulación que en presencia del autoinductor regulan los otros dos sistemas, además de regular diferentes factores de virulencia como proteasas y elastasa. El segundo sistema RhlRI regula al tercer sistema de PQS por activar el regulador PqsR y reprime el gen *pqsH*, además es responsable de producción de ramnolípidos, piocianina, entre otros; y el sistema PqsR/pqs regula la producción de piocianina y cianuro de hidrogeno entre otros.

Fig. 8 Modelo de recombinación homóloga para obtener las fusiones en el cromosoma de *E. coli*. Los genes flanquantes *lacZY* y el gene de *kanamicina* se recombinan y el promotor de *rhlA* se sustituye por el gen *cat* (cloranfenicol) en la cepa Te2680.

Fig. 9 Modelo del promotor artificial Modelo para medir la unión de las proteínas reguladoras de la respuesta sensora de quórum de *Pseudomonas aeruginosa* a distintas cajas *las*, en el fondo genético de *E. coli*.

TABLAS

Tabla 1. Estructuras químicas de diversas señales de comunicación bacteriana.

Modificado de He y Zhang, 2008.

Tabla 2. Ejemplos de sistemas de Quórum sensing en bacterias (Williams P, 2007)

Tabla 3 Secuencia de las cajas *las* de genes regulados por LasR (L) o por LasR/RhIR (LR) (Soberón-Chávez G, *et. al.* 2005)

Tabla 4. Alineamiento de las cajas *las* de genes regulados por LasR (L) o por LasR/RhIR

4 INTRODUCCIÓN.

4.1 Generalidades

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es una bacteria Gram-negativa que pertenece a la clase γ -*proteobacteria*, es un microorganismo considerado ubicuo y altamente adaptable que puede colonizar ecosistemas terrestres y acuáticos; se llega a encontrar en sedimentos, campos petroleros o asociada a plantas y sus rizósferas, en animales incluyendo en humanos (1,2) *P. aeruginosa* es capaz de metabolizar un amplio rango de compuestos orgánicos como fuente de alimento, respirar bajo condiciones anaeróbicas y aeróbicas, metabolizar antibióticos, detergentes, metales pesados y solventes (3) esta versatilidad le permite colonizar nichos ecológicos, donde los nutrientes son escasos para otro tipo de microorganismos. *P. aeruginosa* es un modelo de estudio que ofrece varias áreas de investigación como el biotecnológico en el área de biorremediación, el médico, por ser una bacteria con una alta incidencia nosocomial (4).

P. aeruginosa es un patógeno oportunista de humanos y de otros organismos incluyendo plantas, nemátodos, insectos, peces y mamíferos (5,6). En humanos sanos podemos encontrarlo formando parte de la biota normal, se aísla de la piel, la mucosa nasal, heces y garganta; sin embargo, en personas inmunosuprimidas, como pacientes con cáncer, trasplantados, infectados con VIH, personas quemadas, o pacientes en cuidados intensivos, genera serios procesos, infecciosos (7,8). Es el principal causante de muerte en pacientes con fibrosis quística (FQ), padecimiento que es más frecuente en la población caucásica. La enfermedad es causada por una mutación en el gene *cftR* involucrado en el

transporte de ión cloro hacia el exterior de la membrana celular. La ausencia de esta proteína conduce a la disminución en la función del epitelio reduciendo el transporte de electrolitos y la función secretora del pulmón (9).

4.2 Genoma de *P. aeruginosa*

El primer genoma secuenciado y liberado de *P. aeruginosa* (PAO1) fue en el año 2000, pertenece a un aislado proveniente de una otitis y es la cepa de referencia más utilizada en los trabajos de investigación. Su gran versatilidad radica en la diversidad funcional de su genoma (6.3 Mpb), el cual contiene significativamente más familias de genes de distinto origen que otros genomas comparables en tamaño como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium tuberculosis* (10), tiene un alto contenido de G-C (66%) y cerca de 6,200 marcos de lectura abierta (ORFs). De estos, el 32% no tienen homología con proteínas reportadas. Cerca del 9.4% son genes que participan en la regulación de su genoma, la mayoría de ellos son factores transcripcionales y genes que codifican proteínas reguladoras; aunado a esto se cree que el 6% del genoma de *P. aeruginosa* está regulado por una respuesta colectiva rápida y eficaz para la colonización del huésped. Hasta la fecha se han secuenciado 9454 (www.Pseudomonas.com) aislamientos de *P. aeruginosa* completos o parciales y la disponibilidad y análisis de esta información ha permitido saber que el genoma central "Core" está representado por el 90% del genoma total y en este porcentaje se encuentran los genes que codifican para los factores de virulencia. Esta información también ha permitido saber que, independiente de donde se aislé las cepas, todas son capaces de ser patógenas (11). El otro 10% del genoma total

pertenece al genoma accesorio donde se llegan a encontrar islas de patogenicidad, en estas islas se encuentran elementos integrativos, conjugativos y profagos y secuencias de inserción e integrones (12,13). En esta bacteria se conocen dos islas de patogenicidad que tiene *P. aeruginosa* llamadas PAPI-1 y PAPI.2 que codifican para determinantes de virulencia, esenciales en la infección de modelos animales y plantas; particularmente en la isla PAPI-2 se encuentra el gene que codifica para la citotoxina ExoU, una proteína efectora asociada a la virulencia (13).

4.3 Factores de Virulencia

P. aeruginosa posee diferentes factores de virulencia que son estructuras o mecanismos que contribuyen a la infección y colonización por parte de un patógeno a su huésped; ejemplos de estos son las capsulas, flagelos, sistemas de secreción, la proteasa alcalina, elastasas, pirocianina, ramnolípidos, lectinas, fosfolipasa C, sideróforos, entre otros. Generalmente los factores de virulencia se clasifican en tres: factores asociados a la célula, factores extracelulares y factores de virulencia secretados (14).

Los factores asociados a la célula son las estructuras que permiten tener contacto con el huésped. *P. aeruginosa* utiliza adhesinas como el flagelo, el pili tipo IV, el alginato, el lipolisacárido (LPS) y las lectinas; que en conjunto permiten anclar a *P. aeruginosa* al epitelio del huésped (14). El alginato es un exopolisacárido lineal compuesto por ácido manurónico y glucorónico, es producido particularmente por aislados clínicos mucoides (15), En el caso del

lipopolisacárido (LPS), éste es un glicolípido complejo y es el principal componente en membranas de las bacterias Gram negativas. Las cadenas del polisacárido o antígeno O, se utilizan para la identificación de los 20 serotipos existentes en *P. aeruginosa* (16). En el caso de las lectinas, son proteínas que reconocen y se unen, de manera reversible, a carbohidratos específicos. *P. aeruginosa* tiene dos lectinas, LecA y LecB, las cuales se unen a galactosa y fucosa respectivamente; ambas sirven como adhesinas e inhiben los movimientos ciliares del epitelio pulmonar (17,18).

Los factores de virulencia extracelulares son proteínas bacterianas, los cuales están en la superficie de las células, o pueden ser secretadas en el espacio extracelular, o ser inyectadas en el citosol de la célula huésped. Para llevar a cabo esto último, se requiere de un sistema de secreción (SS), en *P. aeruginosa* se han identificado cinco tipos; tres de ellos se conoce su funcionamiento. El sistema de secreción tipo I (SSTI) está involucrado en la secreción de la proteasa alcalina AprA, la cual es una metalproteasa que está involucrada en la hidrólisis de la fibrina y el fibrinógeno lo que origina un daño tisular (19). Los factores secretados por el sistema de secreción tipo II (SST2) son la exotoxina A o ToxA, las elastasas LasA y elastasa B, la fosfolipasa C hemolítica proteasa IV, lipasa LipC y la fosfatasa alcalina o pho A entre otras (19,20). El sistema de secreción tipo III (SST3) es el más conocido que utiliza *P. aeruginosa* para inyectar toxinas, llamadas efectores dentro del citosol de las células huésped. Es necesario el contacto célula-célula para que sean translocados los efectores del citosol bacteriano hasta el citosol de la célula eucarionte y esto se logra gracias a una

estructura que asemeja a una jeringa y que es conocida como inyectisoma (20,21).

La presencia de los genes que codifican para estos efectores varía de un aislado a otro, pero la presencia de ExoU y ExoS es mutuamente excluyente. ExoS solo está presente en las cepas PAO1 y LESB58 y ExoU solo se encuentra en la cepa PA14. ExoT y ExoY están presentes en las cepas PAO, PA14 y LESB (22). La cepa PA7, un aislado clínico, no secreta ningún efector ya que carece completamente del SST3 (22,23). El sistema de secreción tipo V (SSV) que está involucrado en autotransportador y recientemente se describió el sistema de secreción tipo VI (SSVI) que se ha propuesto que puede ser usado en procesos de competencia intra-especie (22). Fig. 1

Otros factores de virulencia extracelulares que produce *Pseudomonas* son: ramnolípidos, piocianina, cianuro y sideroforos. Los ramnolípidos son glicolípidos que están conformados por una o dos moléculas de ramnosa unidos a lípido. Dentro de sus funciones está degradar los fosfolípidos del surfactante pulmonar (24) y es vital para la invasión del epitelio respiratorio y el establecimiento de la infección (25,26). La piocianina (PCN) es un metabolito secundario con actividad óxido-reductora y responsable de la coloración azul, característico de los aislamientos de *P. aeruginosa* (27). Se le han asignado funciones tales como la de inhibir la respiración celular, la función ciliar, inducción de apoptosis de neutrófilos, disminución de la producción de quimiocinas, prostaglandinas, oxidación del glutatión disminuyendo su concentración intracelular e inactivando la catalasa (27). El cianuro es otro metabolito secretado por esta bacteria, es el responsable de la muerte de organismos eucariontes como *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) y se

ha sugerido que es el responsable de la destrucción de tejidos en pacientes con heridas infectadas (28). La síntesis de este compuesto se lleva a cabo por la descarboxilación oxidativa de la glicina por la HCN sintasa codificada por el operón *hcnABC*. Una vez sintetizada, el HCN difunde rápidamente y actúa a nivel del citocromo C oxidasa, resultando en una disminución en la producción de ATP (28,29). Sin embargo, *P. aeruginosa* para contener con el cianuro Otro factor de virulencia que produce *P. aeruginosa* y que está involucrado en la capacidad de competir por hierro, elemento importante para el crecimiento y desarrollo de las bacterias, pero poco disponible en la naturaleza son los sideroforos. *P. aeruginosa* cuenta con dos: la pioverdina, un pigmento verde-amarillo-fluorescente y la piochelina. Ambos pigmentos se producen en privación de hierro; y su función es quelar el hierro del ambiente e internalizarlo de nuevo en la bacteria a través de receptores específicos en la membrana tales como Fpva y dependientes de la proteína TonB (30). En cuanto a su papel en la virulencia se ha demostrado que mutantes en los genes de la biosíntesis de pioverdina o en los receptores no son virulentos en modelos animales y son importantes en el establecimiento de biopelículas (31). Fig. 1

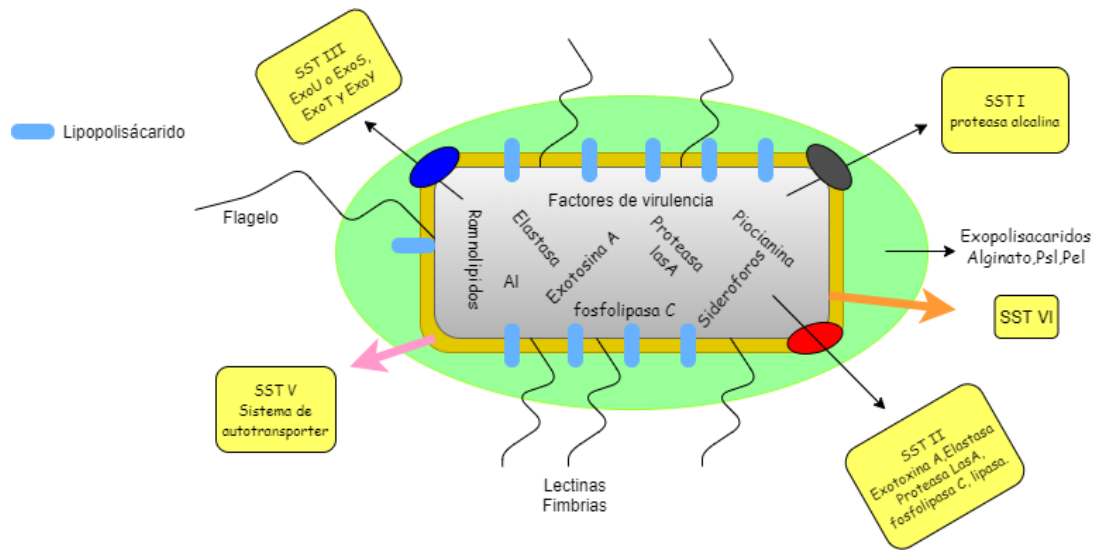


Figura 1. Factores de Virulencia en *P. aeruginosa*. Imagen que muestra los diferentes factores de virulencia que produce *Pseudomonas aeruginosa* y los sistemas de secreción involucrados. Imagen modificada de Stephen P. Diggle 2020⁽¹⁰²⁾

4.4 Respuesta sensora de quórum (RSQ)

El éxito de la colonización y establecimiento de esta bacteria en diferentes nichos es su capacidad que tienen las células de comunicarse. El lenguaje utilizado en esta comunicación consiste en pequeñas moléculas difusibles producidas por la bacteria llamadas autoinductores (AIs) que son las responsables que una población bacteriana regule su comportamiento. A este tipo de comunicación se le acuñó el término de Quórum Sensing (32,33) y se describió por primera vez en las bacterias marinas *Vibrio fischeri* (34) y *Vibrio harveyi* (35), ambas simbioses de los órganos luminosos de algunos peces piña (*Monocentris japonica* y *Cleidopus gloriamaris*) (36), en ambas bacterias se estudiaba la producción de la enzima luciferasa, la cual tiene como finalidad emitir luz (37). De manera general la respuesta sensora de quórum (RSQ) se lleva a cabo a lo largo

de la curva de crecimiento, conforme se va duplicando la bacteria, se sintetiza el autoinductor que se va acumulando hasta alcanzar una concentración crítica, y es cuando interactúan con factores transcripcionales específicos, permitiendo así detectar la densidad celular de la población circundante y responder coordinadamente modificando el patrón de expresión genética ya sea activando o reprimiendo genes (38). Dicho de otra manera, para que se lleve a cabo la regulación genética vía respuesta sensora de quórum se necesita, dos componentes, una enzima que sintetice el autoinductor hasta una cierta concentración y una proteína que detecte, interactúe con el autoinductor, y responda. Fig. 2

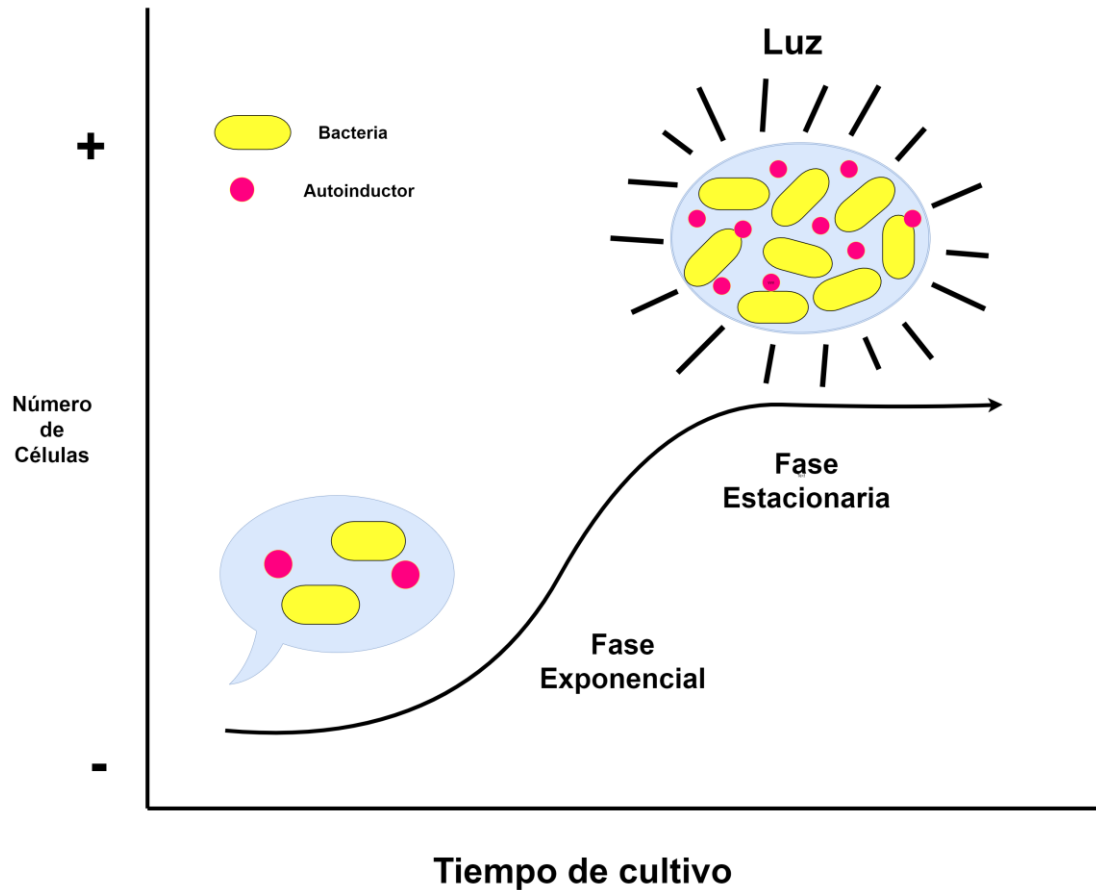


Figura 2 Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum. Conforme la bacteria se va duplicando, el autoinductor se sintetiza y acumula hasta una cierta concentración y es cuando interactúa con una proteína y juntos regulan la expresión genética de la luz. Modificado de Soberón Chávez 2003 ⁽³⁸⁾

Se conoce en la actualidad diferentes señales de comunicación bacteriana, tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, la naturaleza de estas señales varía, comúnmente en Gram positivas encontramos aminoácidos y péptidos cortos, mientras los del tipo acilados de homoserin lactonas, quinolonas o furanosil borato di éster se encuentran en bacterias Gram negativas. En la tabla uno se muestra diferentes ejemplos de estas señales (39). Tabla 1.

Tabla 1. Señales de comunicación en bacterias

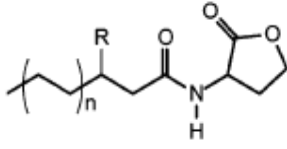
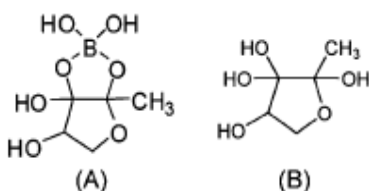
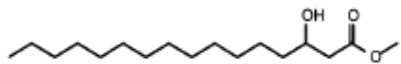
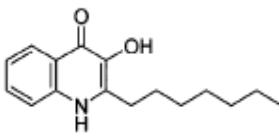
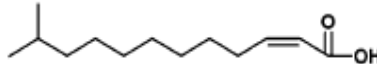
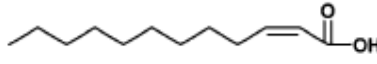
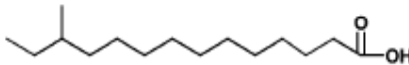
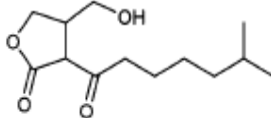
Señal	Estructura	Organismo
Gram-negativos		
<i>N</i> -acil homoserín lactonas (AHL)		<i>Vibrio fischeri</i> (n=1, R=H) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (n=2, R=O) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=4; R=O)
Familia AI-		<i>Vibrio harveyi</i> (A) <i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> (B)
Metil ester ácido hidroxi-		<i>Ralstonia solanacearum</i>
Señal quinolona de <i>Pseudomonas</i> (PQS)		<i>Pseudomonas</i>
		<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Stenotrophomonas</i>
Familia DSF		<i>Burkholderia</i>
		<i>Xylella fastidiosa</i>
Gram-positivos		
γ -butriolactonas		<i>Streptomyces griseus</i>

Tabla 1. Estructuras químicas de diversas señales de comunicación bacteriana. Modificado de He y Zhang, 2008 (39)

4.5 Respuesta sensora de quórum en *Vibrio fischeri*.

Como ya se mencionó la producción de bioluminiscencia está regulada por la RSQ y fue descrita inicialmente en la bacteria marina *Vibrio fischeri*. Esta bacteria puede vivir como simbiote en órganos especiales de algunos peces o calamares, llega alcanzar una alta densidad celular, cerca de 10^{10} a 10^{11} células /ml y es a esta concentración que se induce la producción de luz por la actividad de la enzima luciferasa, esto le confiere cierta protección a su huésped contra depredadores al eliminar su sombra creada por la luz de la luna (33,34,35). El sistema de QS en *Vibrio fischeri* requiere dos componentes; el regulador transcripcional LuxR y la sintasa de la molécula señal LuxI, de allí que se le denomina a este sistema (LuxR/LuxI) (40). Estos genes están dispuestos en unidades transcripcionales divergentes y separadas por una región intergenica regulatoria de 218 pares de bases: el gen *luxR* que codifica para el activador transcripcional LuxR y el gene *luxI*, que da origen a la sintasa del autoinductor, llamado N-(3-oxo-hexanoil)-L-homoserin lactona (OHHL). El activador LuxR, es un polipéptido de 250 aminoácidos que tiene dos dominios, el N-terminal, responsable de la unión del autoinductor OHHL y el C-terminal, requerido para la unión al DNA a través de un motivo H-T-H (hélix-turn-hélix) (40,41). Cuando la densidad celular de *V. fischeri* es baja, el gene *luxI* se expresa a niveles basales y la activación de LuxR es poca, pero cuando la densidad poblacional aumenta, la concentración del autoinductor también, en un orden de 10nM y esta cantidad es suficiente para alcanzar los niveles necesarios para activar la transcripción del operón *lux* mediante la unión de OHHL a LuxR; dicha activación implica la

dimerización y la exposición del dominio H-T-H que se unen a una secuencia específica de 20 pb denominada caja *lux*, con la secuencia 5'-ACCTGTAGGATCGTACAGGT-3', centrada a -40 pb del inicio de la transcripción de *luxI*. El complejo LuxR/OHHL unido a la caja *lux* interacciona con la RNA polimerasa (RNA-P) y activa la transcripción del operón *luxICDABEG* (41,42). Este mecanismo de autoinducción permite la inducción transcripcional del operón que codifica tanto funciones de bioluminiscencia, como de síntesis de OHHL llevando a una producción continua de luz (Fig 3). Cuando la concentración del autoinductor es muy alta, LuxR reprime la transcripción de su propio gene, lo cual provee de una autolimitación al sistema, ya que se requiere de una cantidad de energía considerable para la producción de bioluminiscencia que no es conveniente gastar si no se encuentran condiciones adecuadas (42). Este sistema "sensor de quórum" sólo depende de la densidad celular y no de la composición del medio de cultivo, por lo que se sugiere que se expresa siempre que se alcanza una elevada densidad de bacterias (38).

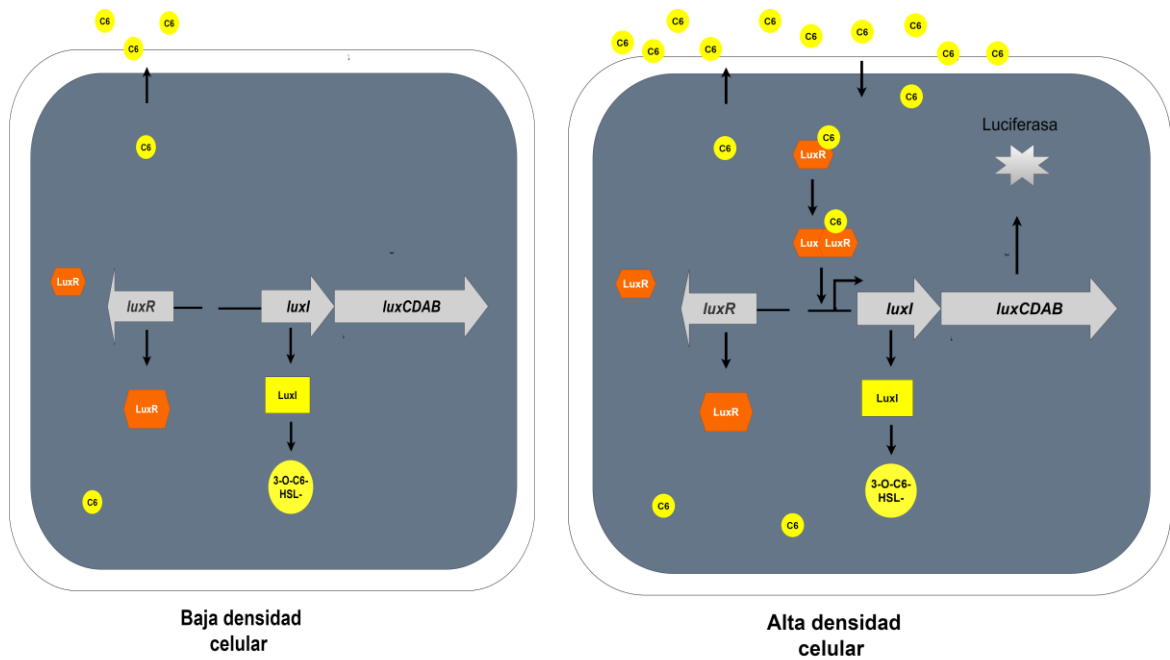


Figura 3 Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum de *Vibrio fischeri*. A una densidad celular baja, la expresión de *luxI* es basal y los niveles de OHHL dentro y fuera de la célula es también baja; pero cuando aumenta la densidad celular también aumenta OHHL y este se une al regulador LuxR, este complejo promueve la transcripción de *luxI* como también los genes de luciferasa. Modificado de Soberón Chávez 2003. (38)

Este tipo de comunicación bacteriana, tipo LuxR/LuxI se encuentra distribuido en diferentes grupos bacterianos, cada especie presenta su propia señal y controla diversos fenotipos (43,44). Ejemplos de esto, se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 2. Ejemplos de sistemas de QS en bacterias (Williams P, 2007) ⁽¹⁰²⁾

Organismo	AHLs	Fenótipo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	C4-HSL, C6-HSL	Biofilms, exoproteasas, virulencia
<i>Aeromonas salmonicida</i>	C4-HSL, C6-HSL	Exoproteasas
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	3-Oxo-C8-HSL	Conjugación
<i>Agrobacterium vitiae</i>	C14:1-HSL, 3-oxo-C16:1-HSL	Virulencia
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	C6-HSL, C8-HSL	Exoenzimas, formación de biofilm, swarming, sideroforos, virulencia.
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	C8-HSL, C10-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL, 3-hydroxy-C10-HSL, 3-hydroxy-C14-HSL.	Virulencia, exoproteasas

<i>Burkholderia mallei</i>	C8-HSL, C10-HSL	Virulencia
<i>Chromobacterium violaceum</i>	C6-HSL	Exoenzimas, pigmentos
<i>Erwinia carotovora</i>	3-Oxo-C6-HSL	Carbapenem, exoenzimas, virulencia
<i>Pantoea (Erwinia) stewartii</i>	3-Oxo-C6-HSL	Exopolisacáridos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C4-HSL; C6-HSL, 3-oxo-C12-HSL	Exoenzimas, exotoxinas, proteínas de secreción, biofilms, swarming, metabolitos secundarios, virulencia.
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	C6-HSL	Fenazinas, proteasas, agregación, colonización en la raíz.
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	C6-HSL	Fenazina-1-carboxamida
<i>Pseudomonas putida</i>	3-Oxo-C10-HSL, 3-oxo-C12-HSL	Biofilm
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3-Oxo-C10-HSL	Mupirocina
<i>Pseudomonas syringae</i>	3-Oxo-C6-HSL	Exopolisacáridos, swimming virulencia.
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	C14:1-HSL, C6-HSL, C7-HSL, C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, 3-hydroxy-C8-HSL	Nodulación/Simbiosis, transferencia de plásmidos, inhibición de crecimiento.
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	7-cis-C14-HSL	Agregación
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	C4-HSL, C6-HSL	Exoproteasas, biofilm biosurfactantes
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	C8-HSL, C12-HSL, 3-oxo-C14-HSL, 3-oxo-C16:1-HSL, C16:1-HSL, C18-HSL	Eficiencia de nodulación simbiosis, exopolisacáridos.
<i>Vibrio fischeri</i>	3-Oxo-C6-HSL	Bioluminescencia

4.6 Respuesta sensora de quórum en *P. aeruginosa*.

En *P. aeruginosa* varios factores de virulencia están regulados por una respuesta sensora de quórum similar a la de *V. fischeri* (45). Dicha respuesta es mucho más compleja que en *V. fischeri*, no solo por los múltiples genes involucrados, sino también porque esta respuesta es modulada por factores medioambientales (46). En *Pseudomonas aeruginosa* existen dos sistemas

homólogos al sistema LuxR/ LuxI de *V. fischeri*; y un tercer sistema que utiliza la 2- alquil- 4-quinolona como señal y se denominado PQS (Pseudomonas Quinolone Signal) (47) y su mecanismo es similar; cuando la concentración de los Als alcanzan concentraciones umbrales dentro de la célula, estos forman un complejo funcional con su respectivo regulador transcripcional, el complejo se une específicamente a secuencias del promotor de los genes regulados por cada sistema de QSR, referidas como cajas *las* (47), estos tres sistemas regulan la expresión genética del 6% del genoma de *P. aeruginosa* (48). A continuación, se describe cada sistema.

4.7 Sistema LasRI

El primer sistema de QS que fue descrito en *P. aeruginosa*, fue el conocido como *lasRI*, está conformado por el regulador LasR y la sintasa LasI que da origen al autoinductor N-(3-oxododecanoil)-L-homoserín-lactona (3-O-C12-HSL); juntos son capaces de unirse a secuencias llamadas cajas *las* y activar la transcripción de los genes que codifican para la elastasa B (49,50), hemolisinas (fosfolipasa C), la exotoxina A y las sintasas LasI y RhII (51), esta última responsable de la síntesis del segundo autoinductor N- butiril-L-homoserín-lactona (C4-HSL) (52), además también activa a los reguladores RhIR (53) y PqsR (54) y a *pqsH* (55), responsable en convertir a HHQ en PQS. Este sistema es activado por el regulador *Vfr* un homólogo de *Crp*, en *E. coli* (56,57). Fig. 4

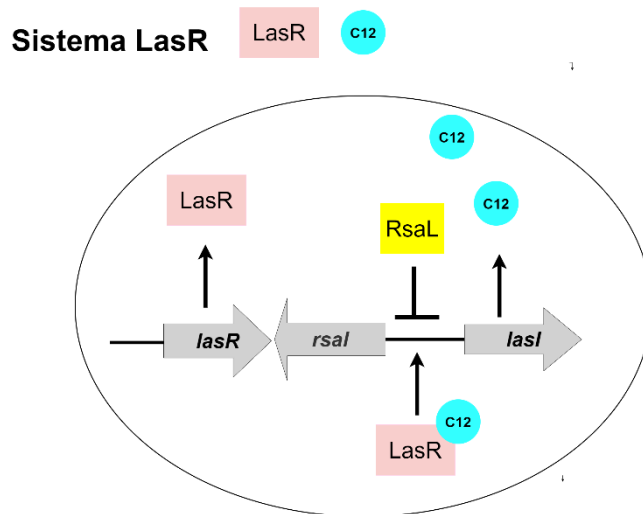


Figura 4. Representación del sistema LasRI. El regulador LasR se une al autoinductor C12- HSL y juntos activan la expresión de los genes *lasI* y *rsaL* y a su vez RsaL reprime la expresión del gen *lasI*, regulando la expresión del autoinductor.

. El sistema *las* es regulado negativamente por la proteína RsaL, la cual se une a la región promotora de *lasI* reprimiendo su expresión (58). 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 LasR. Se conoce que RsaL controla cerca de 130 genes y reprime de forma independiente a su efecto sobre *lasI*, otros genes que son activados por los sistemas Las y RhIR, se ha encontrado que mutantes en el gene *rsaL* generan un fenotipo hipervirulento en el modelo de *Galleria mellonella* y un incremento en la motilidad y la producción de factores de virulencia (59).

4.8 Sistema RhIRI

El nombre acuñado al sistema rhIRI es debido a la regulación en la producción de los ramnolípidos, está formado por el activador transcripcional RhIR y la sintasa RhII (C4-HSL) (60). Cuando el autoinductor interactúa con RhIR se une e interacciona con secuencias las y regulan diferentes genes de virulencia; como son, la producción de ramnolípidos (60), elastasa (61), piocianina (62), HCN (63), lectinas, a su vez este complejo es capaz de regular al sistema PQS y lo puede hacer tanto negativamente reprimiendo al regulador pqsR como positivamente al activar al operón pqsABCDE (64,65). Fig 5

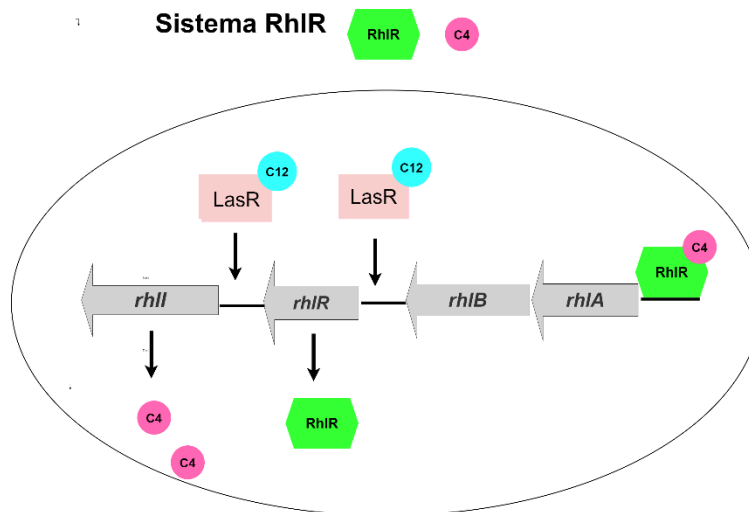


Figura 5. Representación del sistema RhIRI. El sistema LasRI activa la expresión de RhIR y a la sintasa RhII que produce el autoinductor C4-HSL y juntos Regulador-Autoinductor activa la expresión el operón de *rhIABR*.

4.9 Sistema PQS

El sistema PQS (Pseudomonas Quinolone Signal) se reportó inicialmente con experimentos donde se adicionaban extractos producidos por la cepa silvestre *P. aeruginosa* PAO1 al cultivo de la cepa mutante en el gene *lasR* y se observó que sólo se expresó el gen *lasB* en presencia del sistema funcional de *rhlR* (66,67), por otra parte, un análisis de microarreglos se observó que el sistema PQS regulan 141 genes (68). La señal 2-heptil-3hidroxi-4-quinolona mejor conocida como PQS esta codificada por dos operones: *pqsABCDE*, *phnB* y el gene *pqsH* (69). El operón *pqsABCDE* da origen al precursor HHQ, el cual se convierte en PQS por la actividad del gene *pqsH*, este operón se activa por el regulador PqsR, un regulador transcripcional de la familia LysR, solo si esta en presencia de PQS y HHQ, generando así un circuito de regulación positiva (54,67,69). La importancia de PQS en la producción de factores de virulencia e infección de *P. aeruginosa* es aun debatible, no obstante, mutantes en este sistema muestran una significativa reducción en la producción de pirocianina, elastasa, lectina A, ramnolípidos y en la formación de biopelículas (55), así mismo, es requerido para su virulencia en plantas y nematodos (69). Fig. 6

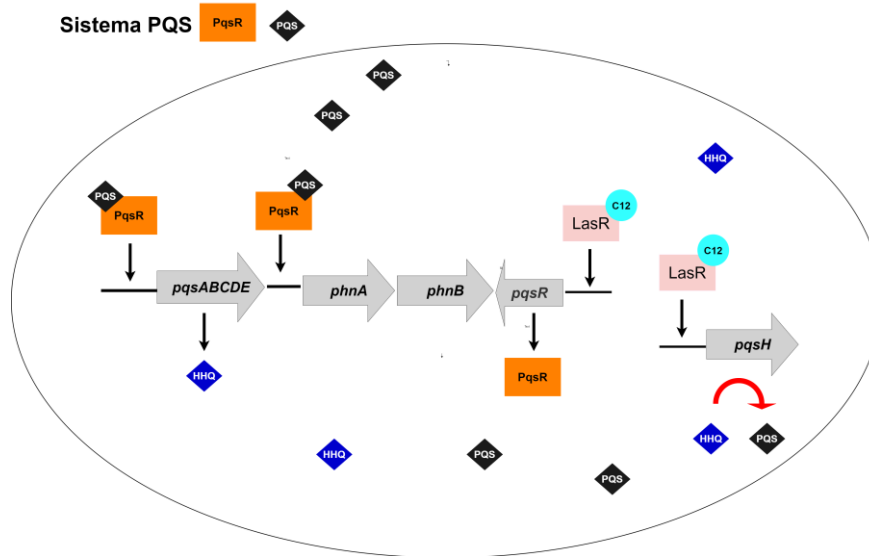


Figura 6. Representación del sistema PqS El sistema LasRI activa la expresión del regulador PqsR y PqsH, este último convierte la molécula de HHQ a PQS, a su vez PQS unido a PqsR activa la expresión del operón *pqsABCDE* responsable de sintetizar HHQ y *phnAB*.

Otros genes que se ha visto que están involucrados en la producción de PQS, son los genes *pqsL* y *pqsE*. Mutantes en *pqsL* sobre expresan PQS y acumulan HHQ ocasionando autólisis y muerte de la bacteria (70). El gen *pqsE*, aunque es parte del operón, codifica para una Tioesterasa que forma parte de la biosíntesis de alquil quinolona; una mutante en este gene no afecta la producción de PQS ni de HHQ, sin embargo, no producen pirocianina, lo cual sugiere un papel en la capacidad de responder a PQS efectivamente por parte de la bacteria y a través de una señal desconocida (71).

4.10 Relación entre los sistemas de QS

Los sistemas *las*, *rhIR* y *pqsR* están autoregulados y conectados formando una cascada de regulación encabezada por LasR (72,73,74) cuya expresión inicia en la fase exponencial y se incrementa en la fase estacionaria. Sin embargo,

diversos estudios muestran que dicha jerarquía es flexible y está condicionada principalmente por la disponibilidad de hierro y fosfatos. El primer regulador del sistema es LasR, que unido al autoinductor 3O-C₁₂-HSL, modula positivamente la transcripción de los otros dos sistemas rhlR y PqsR, específicamente activa tanto a las sintasas LasI, RhII como a los reguladores RhIR y pqsR y al gen *pqsH*.(76)

La relación del sistema PQS con los sistemas *las* y *rhl* es antagonica y se da por la dependencia de la transcripción positiva de *pqsR* y *pqsH* por parte de LasR/ LasI y la represión de *pqsABCDE* y *pqsR* por RhIR/rhII, ambos efectos dependientes de la relación de los AIs (70,77,78). Fig. 7.

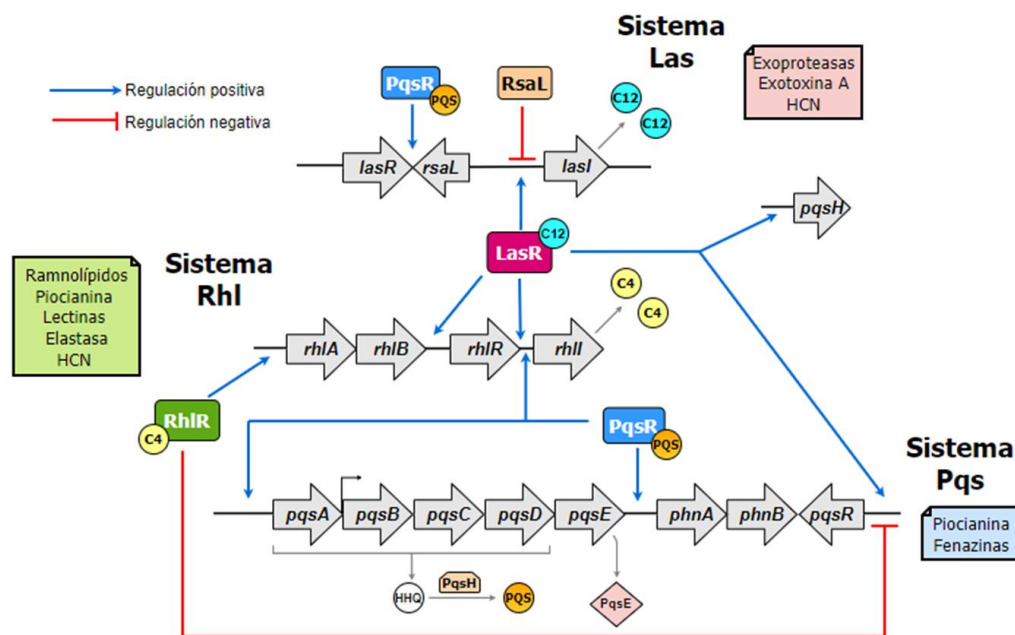


Figura 7. Modelo de activación de la respuesta sensora de quórum en *P. aeruginosa*. Modificado de García-Reyes, S. *et. al.* 2020. *P. aeruginosa* tiene 3 sistemas dependientes de la densidad celular, dos de ellos son dependientes de moléculas tipo homoserin lactona y otra de naturaleza de quinolona. El primer sistema LasRI encabeza la cascada de regulación que en presencia del autoinductor regulan los otros dos sistemas, además de regular diferentes factores de virulencia como proteasas y elastasa. El segundo sistema RhIRI regula al tercer sistema de PQS por activar el regulador PqsR y reprime el gen *pqsH*, además es responsable de producción de ramnolípidos, píocianina, entre otros; y el sistema *pqsR/pqs* regula la producción de píocianina y cianuro de hidrogeno entre otros. (77)

La expresión de factores de virulencia a través del sistema QS en *P. aeruginosa* es dependiente de la fase de crecimiento. El factor sigma de la fase estacionaria RpoS (σ S), tiene efecto sobre algunos genes regulados por el sistema QS y que son expresados en esta etapa de crecimiento (79,80). Aunque hay una inducción marginal de RpoS sobre los genes *lasR* y *rhIR* en la fase estacionaria, se sugiere que el mecanismo de regulación sobre los genes dependientes de QS es indirecto por los reguladores. RpoS regula positivamente a *lecA*, *algR* y *toxA*, entre otros y reprime la expresión de los operones *hcnABC* y *phzA1* (81).

4.11 Familia de activadores transcripcionales LuxR

El regulador mejor estudiado en el modelo de regulación genética que depende de la densidad celular es LuxR. Es una proteína citoplasmática que pertenece a la familia de reguladores tipo H-T-H (hélice-vuelta- hélice) consta de 250 aminoácidos en dos dominios, hacia la región amino terminal se encuentra el sitio de unión al autoinductor 3-oxo-hexanoil homoserin lactona, y hacia la región carboxilo terminal se encuentra el dominio de unión al DNA. Al unirse al autoinductor se dimeriza y se une a la región regulatoria del operón *lux*, una secuencia palíndroma imperfecta de 20 pb llamada caja *lux* localizada en la región promotora de *luxI* a -40 pb del inicio de la transcripción. La región C-terminal de este regulador interactúa directamente con la subunidad alfa de la RNA polimerasa (RNAP), permitiendo su reclutamiento al promotor *luxI* (41,42). Existen toda una familia de reguladores tipo *lux*. En la tabla 3, (82) se muestran algunos ejemplos.

Tabla 3. Algunos ejemplos de reguladores LuxR. Modificado de Bassler 2001⁽⁸²⁾

Bacteria	Regulador	Señal	Fenótipo
<i>Vibrio fischeri</i>	LuxR-LuxI	3-oxo-C6-HSL	Bioluminiscencia
	AinR-AinS	C8-HSL	Bioluminiscencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	LasR-LasI	3-oxo-C12-HSL	Elastasa, proteasa alcanlina
	RhIR-RhII	C4-HSL	Piocianina, ramnolípidos.
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	TraR-Tral	3-oxo-C8-HSL	Conjugación
<i>Erwinia caratovora</i>	CarR-CarI ExpR	3-oxo-C6-HSL	Antibióticos y exoenzimas.
<i>Pantoea stewartii</i>	EsaR-EsaR	3-oxo-C6-HSL	Exopolisacarido
<i>Rhodobacter Sphaeroides</i>	CerR-CerI	C14-HSL	Agregación
<i>Vibrio anguillarum</i>	VanR-VanI	3-oxo-C10-HSL	Agregación y movilidad

4.12 Regulación Transcripcional por LasR.

En el año 2002, usando la interacción con la proteína LexA se demostró que LasR es un activador transcripcional que sólo lleva a cabo su función cuando está acompañado con el autoinductor 3O-C12-HSL su estado formando multímeros (83). Mediante fusiones transcripcionales *rhIR::lacZ* en una mutante *lasR* se demostró que LasR regula la expresión de *rhIR* (54,84) y promueve la transcripción de los genes elastasas A y B, así como otras proteasas (73,74,75) y genes que codifican para las sintetisas de los autoinductores C4-HSL y 3O-C12-HSL respectivamente (52,53). En el 2004 se purificó la proteína LasR y se evaluó su

unión a diferentes promotores. Se encontró que esta proteína efectivamente es un dímero en presencia del 3O-C12-HSL, y que se une específicamente a las cajas de ciertos genes como se había inferido por los datos *in vivo*, pero sorpresivamente esta proteína se unió a otras secuencias que no habían sido identificadas por medios genéticos y que no son del tipo de las cajas *las* conocidas (85).

Este mecanismo de dimerizarse se ha observado también en otros reguladores transcripcionales de la respuesta sensora de quórum como es LuxR en *V. fischeri* y *Erwinia carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*

4.13 Regulación Transcripcional por RhIR.

La proteína RhIR es responsable de promover la transcripción de genes que codifican para la producción del biosurfactante ramnolípido, tales como el operón *rhIAB*, que codifica para la ramnosiltransferasa 1 (54,86) y *rhIC* que codifica para la ramnosiltransferasa 2 (87), y el operón de rmlBDAC (88) que está involucrado en la producción de ramnosa. Se han reportado otros factores de virulencia como la piocianina y cianida de hidrógeno que están también bajo el control del sistema RhIR (71).

La unión de RhIR a la caja de *rhIAB* no se ve afectada por el 3O-C12-HSL (73). Sin embargo, mediante una fusión *rhIA::lacZ* se observó que la interacción de RhIR con este autoinductor compite la unión del C4-HSL y disminuye su actividad de activador transcripcional (73). Actualmente se desconoce el mecanismo mediante el cual esta interacción con el 3O-C12-HSL afecta la actividad

transcripcional de RhIR. Así mismo RhIR en ausencia del autoinductor C4-HSL reprime la expresión de *lasB* y de su propio gene *rhIR* (86).

Hubo muchos intentos por purificar a RhIR en años pasados pero las estrategias estaban basadas en purificarlo con su autoinductor C4-HSL y la mayoría de veces no se podía tener una fracción soluble que permitiera que el regulador fuese funcional, otros intentos que se realizaron fue tratar de plegarla *in vitro* pero aun así la actividad era muy baja (89), fue hasta el año 2018 que se logró purificar este regulador en presencia del ligando llamado *meta*-bromotiolactona (mBTL), el cual fue capaz de estabilizar a RhIR y se evaluó su funcionalidad tanto *in vitro* por ensayos de EMSA como *in vivo*, activando una fusión transcripcional del promotor de *rhIA* fusionado a *lux* en *E.coli* (90).

4.14 Especificidad de las cajas *las*.

Como se mencionó anteriormente los reguladores transcripcionales de la familia LuxR, se unen a una secuencia palíndrica imperfecta de 18 a 20 pares de bases, centrada aproximadamente a -42 pb del inicio de la transcripción (41,42). En *P. aeruginosa* esta secuencia se le llama caja *las* y posee el consenso N₂CT-N₁₂-AGN₂, pero fuera de las bases invariables no se sabe cuáles son las bases importantes para la especificidad de pegado de las diferentes proteínas reguladoras (91,92). Las cajas *las* pueden ser reguladas por LasR, RhIR o por ambos reguladores transcripcionales, y los cambios que existen entre estas cajas pueden representar grandes diferencias por la afinidad del regulador (93,94). En la Tabla 3 se muestran algunas de estas cajas *las*.⁽⁹¹⁾

Tabla 3 Secuencia de las cajas las de genes regulados por LasR (L) o por LasR/RhIR (LR)

Gene	Secuencia	R	Referencia
RsaL	AACTAGCAAATGAGATAGAT	L	De Kievit et al., 1999
qsc-104(PA2592)	AACTACCAGTTCTGGTAGGT	L	Whiteley et al., 1999
LasI	ATCTATCTCATTTGCTAGTT	L	Seed et al., 1995
LasA	TACTGGAAAAGCTGATAGTT	L	Toder et al., 1994
lasB OP2	ACCTGCTTTTCTG-CTAGCT	L	Rust et al., 1996
rhIR-2	CCCTCGCCCCACGACCAGTT	L	Medina et al., 2003 ^a
qsc-102(PA1897)	ACCTGCCCGGAAGGGCAGGT	L	Whiteley et al., 1999
rhIR-1	ATCTGCGCGCTTG-ACAGCG	L	Medina et al., 2003
LecA	TCCTGCATGAATTGGTAGGC	LR	Winzer et al., 2000
HcnA	ACCTACCAGAAATGGCAGGG	LR	Pessi & Hass, 2000
RhIA	TCCTGTGAAATCTGGCAGTT	LR	Pearson et al., 1997
qsc-117(PA1869)	CACTGCCAGATCTGGCAGTT	LR	Whiteley et al., 1999
lasB OP1	ACCTGCCAGTTCTGGCAGGT	LR	Rust et al., 1996
RhII	CCCTACCAGATCTGGCAGGT	LR	De Kievit et al., 2002
phzA1	ACCTACCAGATCTTGTAGTT	LR	Whiteley et al., 1999
qsc-126(PA3327)	ACCTAACAGATTTGTAAGTT	LR	Whiteley et al., 1999
qsc-132(PA4217)	CCCTACGCGGCCTTGGAGCC	LR	Whiteley et al., 1999
rhIIS2b	CAAGAATTGATCTGGCAGGT	LR	De Kievit et al. 2002
qsc-1028 A-13T	ACCTGCCAGGAATGGCAGGT	LR	Whiteley & Greenberg 2001

Ejemplos de las cajas lux, en negritas se encuentran las bases invariables CT y AG. Los nucleótidos en *itálicas* son excepciones a los consensos propuestos para las cajas las regulados por LasR/3O-C12-HSL y RhIR/ C4-HSL. Los nucleótidos que se encuentran subrayados en las cajas lasB, rhII, phzA1 y hcnA son diferencias con respecto a la caja las de rhIA, y estas diferencias pudieran estar involucradas en la regulación diferencial de LasR/3O-C12-HSL y RhIR/ C4-HSL. Tomado de Soberón-Chavez, G. *et. al.* 2005.(89)

Salvo en casos contados (73,74,75), no existe evidencia directa de la unión de las proteínas reguladoras a determinada caja *las*. La información que se presenta en la Tabla 3, por tanto, representa en su mayoría datos indirectos basados en similitud de secuencia y en patrones de regulación en mutantes de *P. aeruginosa* en genes de la respuesta sensora de quórum o en su expresión en *E. coli* en presencia de un determinado regulador y autoinductor. Es claro, pues, que para varias de las cajas *las* no hay datos de unión directa de ninguna de las proteínas y que lo que se ha predicho de la especificidad en la mayoría de los casos es basado en datos indirectos. (95)

Por otra parte, como se puede observar en esta tabla, existen genes regulados por la respuesta sensora de quórum, tales como *lasB* (96) y *rhIR*(54) que tienen dos cajas *las* funcionales. En el caso de *lasB* y *hcnA* una de estas cajas juega un papel principal en la activación genética (94,96,97), mientras que para el gene *rhIR*, LasR/3O-C₁₂-HSL, se une a la primera caja (*las box-1*) y activa su expresión y para la segunda caja (*las box-2*), este mismo regulador tiene un efecto negativo (54).

Por ensayos de mutagénesis de genes regulados por la respuesta sensora de quórum, se postuló las características que debían tener las cajas *las* y se les nombro cajas tipo L y las llamadas tipo LR (Tabla 3). Aquellas cajas que fueron activadas por LasR/3O-C₁₂-HSL presentaban la secuencia NNCTN₁₂AGNN, donde las letras en negritas son bases invariables. Sin embargo, esto no siempre se cumple ya que Medina *et al.* (54) y Rust *et al.*, (97,98) reportaron que cajas con 11, en lugar de 12 nucleótidos entre los sitios consenso son también funcionales y son reconocidos por LasR/3O-C₁₂-HSL. Por otra parte, las cajas *las* que son

reconocidas por ambos reguladores presentan la siguiente secuencia NNCTN₃AN₄TN₃AGNN. Cabe señalar que esta regla tampoco se cumplen su totalidad ya que la caja las de *lecA* no tiene la adenina conservada en la posición 8(94). Asimismo, se sabe que, aunque las cajas llamadas LR pueden ser reconocidas tanto por LasR/3O-C12-HSL como por RhIR/C4-HSL, lo hacen con distinta especificidad. Por ejemplo, RhIA es activado por LasR/3O-C12-HSL sólo en un 10% de lo que lo hace por RhIR/C4-HSL (86), mientras que el caso de *lasB* es el contrario, siendo mayor la especificidad por LasR/3O-C12-HSL(97). No se sabe qué determina la afinidad por cada uno de los reguladores, en el caso de las cajas que son reguladas por ambos reguladores. Para verificar la especificidad de los reguladores Whiteley y Greenberg (94,95), hicieron mutagénesis dirigida y midieron los cambios en la activación transcripcional, encontrando que, cuando se introduce una adenina en la posición 8 y una timina en la posición 13 de las cajas tipo-L, ahora son reconocidas por RhIR/C4-HSL además de por LasR/3O-C12-HSL, es decir cambia la especificidad.

4.15 Sistemas de Represión.

Muchos activadores transcripcionales pueden funcionar como represores de promotores artificiales, simplemente con la unión del activador al DNA ya sea sobrelapando o posicionando río abajo de la región de unión de la RNA polimerasa, de tal manera que esta unión (activador-DNA) puede separarse de su interacción con la RNA polimerasa y medirse *in vivo*. Se han utilizado sistemas de represión para estudiar la regulación de luciferasa en *V. fischeri*, la síntesis polisacárido exocapsular en *Pantoea stewartii* y *ExpR_{Ecc}* y la regulación de síntesis

de pectinasas en *Erwinia carotovora*. Este sistema consistió en fusionar con el gene de *lacZ*, la secuencias TTGACA y TATAAT que corresponden a la región -35 y -10 del promotor sigma 70, espaciadas con la secuencia de 18 pares de bases de la caja lux y se demostró; para todos los casos, que en presencia del regulador y su respectivo autoinductor, la expresión transcripcional del gene *lacZ* se redujo (99).

5 ANTECEDENTES

El trabajo de maestría que realicé en el laboratorio de la Dra. Soberón del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM, consistió en evaluar la unión de las proteínas de RhIR y LasR a distintas cajas *las* mediante un sistema *in vivo*, usando a *E. coli* como modelo. Encontré datos que sugieren que RhIR se une con y sin su inductor C4-HSL a la caja *las* de *rhIA*, en concordancia con lo encontrado mediante geles de retardamiento, a diferencia de la caja de *lecA* que solo se une en presencia de C4-HSL y por otra parte esta caja también es reconocida por el complejo LasR/3O-C12-HSL.

Como se puede ver en la Tabla 4, las cajas *rhIA*, *lecA* y *rmIB*, son activadas por RhIR/C4-HSL, pero presentan distintas bases en las posiciones 11 y 12, por lo que pensamos que dichas posiciones no estarían involucradas en la determinación de la especificidad de RhIR vs LasR. Por otra parte, la caja *lecA* no presenta la A en la posición 8, y se ha propuesto que es fundamental para el reconocimiento por RhIR/C4-HSL (95). Ya que encontré en mi tesis de maestría que LasR/3-O-C12-HSL puede unirse a la caja de *lecA* y no a las de *rhIA* y *rmIB*,

podiera ser que la posición 8, jugara un papel en la determinación de la especificidad de unión.

Tabla 4. Alineamiento de las cajas *las* de genes regulados por LasR (L) o por LasR/RhIR

GENE	secuencia caja <i>las</i>	Regulación
rmlB	A C C T A C C A G A T C T G G G G T T G	R
lecA	T C C T G C A T G A A T T G G T A G G C	LR
rhIA	T C C T G T G A A A T C T G G C A G T T	LR
phzA1	A C C T A C C A G A T C T T G T A G T T	LR
lasB OP1	A C C T G C C A G T T C T G G C A G G T	LR
rhII	C C C T A C C A G A T C T G G C A G G T	LR
lasI	A T C T A T C T C A T T T G C T A G T T	L

Alineamiento de diferentes cajas *las* donde se muestra las posiciones invariables en las posiciones 3 y 4 y 17 y 18

De tal forma que es interés del laboratorio de la Dra. Gloria Soberón, y el objetivo de esta tesis es estudiar la unión de los reguladores transcripcionales *in vivo* a las cajas *las* de los genes *rhIA* y *lecA*.

6 Hipótesis

Un número reducido de bases de las cajas *las* determina la especificidad de unión de las proteínas RhIR o LasR.

7 Objetivo General

Determinar la especificidad de unión de RhIR y LasR a las cajas *las* de los promotores *rhIA* y *lecA* usando mutantes puntuales en las posiciones 8, 11 y 12, así como el efecto de estas posiciones en la activación transcripcional por estos reguladores.

8 Objetivos Específicos

- a) Determinar la especificidad de la unión de RhIR y LasR a las cajas *las* de los genes *rhIA* y *lecA*, así como también los cambios en las posiciones 8, 11 y 12 a través de ensayos *in vivo* en *E. coli*.
- b) Determinar la actividad transcripcional de los promotores *rhIA* y *lecA* y evaluar el efecto de los cambios puntuales en las posiciones 8, 11 y 12 de las cajas *las*, en la bacteria *E. coli*.
- c) Determinar la actividad transcripcional de los promotores *rhIA* y *lecA* y el efecto de los cambios puntuales en las posiciones 8, 11 y 12 de las cajas *las*, en *P.aeruginosa* PAO1 así como en las mutantes *rhIR* y la doble mutante Δ *las/rhlI*

9 Estrategia experimental.

9.1 Construcción de promotor artificial y los cambios 8,11 y 12.

Para estudiar la interacción de los reguladores LasR y RhIR, de la respuesta sensora de quórum de *P. aeruginosa*, a las cajas *las* de los genes *rhIA*, *lecA* y los cambios sencillos en las posiciones 8 (A→T), 11 (T→A) y 12 (C→T), los

dobles 8(A→T)/11(T→A), 8(A→T)/12(C→T) y 11 (T→A) /12 (C→T) y la triple 8 (A→T)/ 11 (T→A)/ 12 (C→T), se diseñó un sistema que permitiera medir esta unión (DNA-Regulador), haciendo un promotor artificial. Este promotor artificial consistió en fusionar con el gene de *lacZ*, las cajas del promotor sigma 70 -35 (TTGACA) y -10 (TATAAT) espaciadas con la secuencia de las cajas *las* rhlA y *lecA*. (Tabla 4.) Como se mencionó anteriormente, las cajas *las* constan de 20 pares de bases, pero en nuestro diseño experimental incluimos únicamente 19, ya que, en la gran mayoría de las secuencias, la última base es una T que coincide con la primera T de la secuencia -10 del promotor. A los lados de estas secuencias se incluyeron secuencias de reconocimiento para las enzimas *EcoR1* y *BamH1*. Estas secuencias de reconocimiento no son complementarias en los dos oligonucleótidos, sino que quedan algunas bases no apareadas, como sería el producto después de que las enzimas hubieran hecho el corte de un DNA de doble cadena. Dichos oligonucleótidos se hibridaron 1:1 a una temperatura de 60°C y la doble cadena se clonó en los sitios *EcoR1-BamH1* del plásmido pRS551, (100) el cual se transformó en la cepa *E. coli* Top10. Las transformantes se seleccionaron en cajas con ampicilina (200 µg/ml) y 40µg/ml de (X-gal). Las colonias azules resultantes se purificaron estriando dos veces una colonia aislada y de ellas se purificó el plásmido mediante el kit de Qiagen, según las instrucciones del fabricante. Los plásmidos obtenidos se mandaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología (UNAM) para estar seguros de que no hubiera algún cambio. Con la finalidad de obtener las fusiones transcripcionales en el cromosoma de *E. coli*, se transformó químicamente cada plásmido digerido con la endonucleasa *Xho1* en la cepa de *E. coli* Te2680 (101), de tal forma que por

recombinación homóloga se insertaría el promotor artificial. Fig. 8. Las transconjugantes se seleccionaron en kanamicina (100 µg/ml) en presencia de X-gal. Las colonias sensibles a ampicilina y cloranfenicol, pero resistentes a kanamicina y con un fenotipo azul fueron las que llevaban la fusión en el cromosoma. Dicha fusión se movilizó a la cepa MC4100 (102) por el método de transducción con la ayuda del fago P1 *vir*

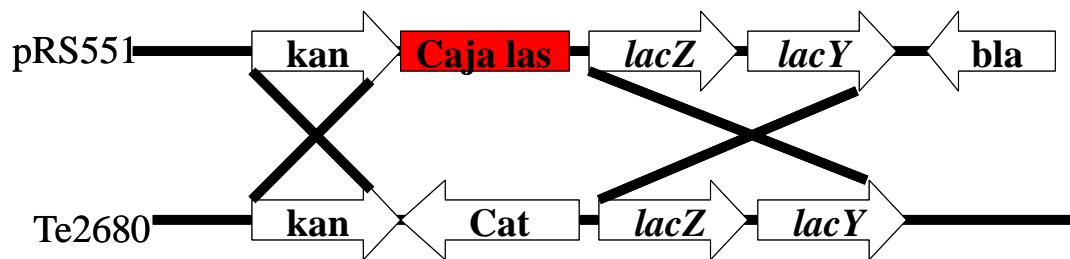


Fig. 8 Modelo de recombinación homóloga para obtener las fusiones en el cromosoma de *E. coli*. Los genes flanqueantes *lacZY* y el *gene de kanamicina* se recombinan y el promotor de *rhIA* se sustituye por el gen *cat* (cloranfenicol) en la cepa Te2680. ⁽¹⁰¹⁾

Posteriormente dichas fusiones se transformaron químicamente con derivados del plásmido pUCP20 que codifican para los reguladores transcripcionales LasR o RhIR y como control se usó el plásmido pUCP20 sin inserto.

Para determinar la unión de los reguladores transcripcionales LasR y RhIR a las cajas *las* de *rhIA*, *lecA* y sus derivados, se cuantificó la actividad de β-galactosidasa descrita por Miller (103), en presencia o ausencia del autoinductor C12-HSL o C4-HSL. En ausencia de las proteínas reguladoras, la actividad de β-galactosidasa se tomaría como 100% del valor máximo posible (Fig. 5A), dado no habría algún impedimento para que la polimerasa se uniera a los sitios consenso -

10 y -35 y transcribiera el gene *lacZ*, mientras que en el caso donde hubiera regulador la actividad β -galactosidasa disminuiría dado por el impedimento que ejerce el regulador al unirse a su caja *las*. De tal forma que con dicho sistema podríamos saber *in vivo*, qué regulador se une a las cajas *las* y cómo los autoinductores modulan esta interacción. (Fig. 5B)

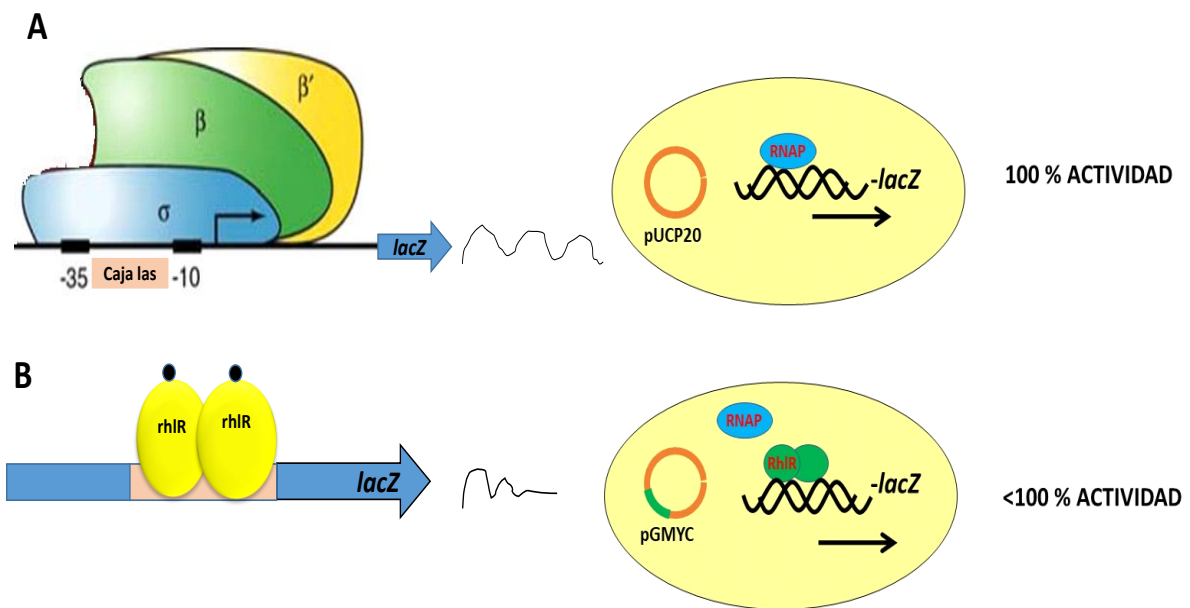


Fig. 9 Modelo del promotor artificial para medir la unión de las proteínas reguladoras de la respuesta sensora de quórum de *Pseudomonas aeruginosa* a distintas cajas *las*, en el fondo genético de *E. coli*.

9.2 Construcción del promotor natural de *rhIA*.

Para construir las fusiones transcripcionales de *rhIA* y *lecA* se utilizó la misma metodología. Se amplificó una región del promotor de *rhIA* (-476 +80) con los oligos *rhIAf* y *rhIAr* a partir del ADN cromosomal de *P. aeruginosa*, el producto se clono en el vector pJET 1.2/blunt (Thermo Scientific) bajo las recomendaciones del fabricante, se transformaron en *E. coli* y la candidata se le nombro pJrhIAntf,

se mandó a secuenciar en el Instituto de Biotecnología, después de verificar que el plásmido no tenía ningún cambio se subclonó en el vector pMP220 (104) en los sitios EcoR1-Pst1, o en el vector pLP170 (105) en los sitios EcoR1-XhoI.

9.3 MUTAGENESIS SITIO DIRIGIDA

Para obtener los cambios en la caja las de *rhIA* en la posición 8, 11 y 12 se utilizó la técnica de mutagenesis sitio dirigida con la ayuda del kit Quick Change XL (Agilent Technologies), de los oligonucleótidos con los cambios sencillos en la posición 8 (A→T), 11 (T→A) y 12 (C→T), los dobles 8(A→T)/11(T→A), 8(A→T)/12(C→T) y 11 (T→A) /12 (C→T) y la triple 8 (A→T)/ 11 (T→A)/ 12 (C→T), previamente sintetizados y como templado se utilizó el plásmido pJrhIA_{ntf}, todo se realizó como lo sugiere el fabricante. Se escogieron dos candidatas por cada cambio y se mandaron a secuenciar para comprobar que el cambio se había realizado, posteriormente se subclonó cada plásmido de la misma manera que el promotor silvestre en los vectores pMP220 y pLP170.

9.4 Actividad del promotor de *rhIA* en *E. Coli* y *P. aeruginosa*

Para evaluar la actividad del promotor de *rhIA* en *E. coli* se utilizó la cepa DH5 α , en ella se transformaron los plásmidos que llevan la secuencia del promotor silvestre y aquellos que llevan los diferentes cambios y se midió la actividad de la enzima β -galactosidasa en presencia de los reguladores LasR o RhIR en presencia o ausencia de sus respectivos autoinductores.

Para saber el efecto de las mutaciones en la caja de *rhIA* en el fondo de *P. aeruginosa*, los plásmidos fueron transformados en la cepa *pao1* y en la doble mutante en las sintasas $\Delta lasIrhII$, se midió la actividad de la enzima β -galactosidasa y en el caso de la doble mutante se evaluó la actividad en presencia o ausencia de los autoinductores.

9.5 EMSA

El ensayo de geles de retardo se realizó en colaboración con la Dra. Katy Juárez y el Dr. Alberto Hernández- Eligio de la siguiente manera:

Para realizar el Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) se amplificaron los fragmentos del promotor silvestre de la región reguladora de *rhIA*, de la mutante sencilla *rhIA-12 (C→T)* o de la doble mutante *rhIA 11 (T→A)/ 12 (C→T)* a partir de los plásmidos previamente construidos, de igual manera se amplificó el promotor de *lecA* (508 pb) y *lasI* (198 pb) a partir de ADN cromosómico de *P. aeruginosa* y se utilizó como control negativo en las reacciones de unión al ADN un fragmento de la región reguladora del gen GUS303 de *Geobacter sulfurreducens*. Las reacciones de unión se realizaron mezclando 0,5 ng de cada producto de PCR marcado con (γ - ^{32}P) - γ dATP con concentraciones crecientes del extracto de proteína en un volumen final de 20 μ L de amortiguador de unión, que contenía Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM., DTT 1 mM, EDTA 0,5 mM, glicerol al 5% (vol / vol), 10 μ g IL 1 BSA y 0,2 μ g poli (dl-dC). Para la interacción proteína-ADN, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego se separaron por electroforesis en geles de

poliacrilamida no desnaturalizantes al 6% en un amortiguador Tris-borato-EDTA a temperatura ambiente.

10 RESULTADOS

Como resultado del trabajo se publicó el siguiente artículo.

Abigail González-Valdez, Luis Servín-González, Katy Juárez, José-Alberto Hernández (2014). Effect of specific *rhIA* las-box mutations in DNA binding and gene activation by *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcriptional regulators RhIR and LasR. Gloria Soberón-Chávez. FEMS Microbiol Lett. 2014 Jul; 356 (2):217-25.

11 DISCUSIÓN GENERAL

La regulación transcripcional de diferentes factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* está regulada por la respuesta sensora de quórum; en esta regulación intervienen varios factores, pero un elemento crucial son las secuencias de las bases que conforman las cajas *las*.

Para evaluar la especificidad de unión *in vivo* de los reguladores LasR y RhIR a las cajas *las* de *rhIA* y *lecA* se diseñó un sistema de promotores artificiales-lacZ para las cajas *las* *rhIA* y *lecA*, así como también se realizaron cambios en las posiciones 8, 11 y 12 y se determinó el efecto de los reguladores transcripcionales, cuantificando el porcentaje de represión de la actividad de β -galactosidasa en presencia o ausencia de los autoinductores. De acuerdo con los ensayos de unión, encontramos que el regulador RhIR es capaz de unirse a la

secuencia de *rhlA* tanto en presencia como en ausencia de su autoinductor, como ya se había reportado (Medina, G., et. al. 2003), y este dato correlaciona con los ensayos de EMSA. En contraste, la secuencia de *lecA*, es reconocida por LasR o RhIR, pero solo cuando están en presencia de su propio autoinductor, lo que nos indica que las bases que hay entre las invariables si son importantes para la unión de los reguladores al DNA.

Para saber cuáles eran las bases que pudieran determinar la especificidad, hicimos varios cambios y encontramos que cuando se introduce el cambio en la posición 8 (A→T) en la secuencia de *rhlA*, la actividad de β-galactosidasa es mucho menor comparada con la secuencia silvestre y esto es independiente de si está o no presente el autoinductor C4-HSL en el medio, este dato sugiere, que la Timina afecta la unión de RhIR al DNA, posiblemente porque se pierde la interacción DNA-RhIR. En contraste cuando el cambio es en la posición 11 (T→A) no se observa que disminuya la actividad y por lo tanto, este cambio no afecta la unión de RhIR. Sin embargo, si se cambia la posición 12 (C→T), sólo se afecta cuando el autoinductor C4-HSL está ausente; presentando el mismo comportamiento que presenta la caja de *lecA*. Estos datos sugieren aparentemente que RhIR se puede unir al DNA en ausencia de su autoinductor a la caja las cuando en la posición 12 se encuentre una citosina mientras que en presencia de C4-HSL la reconoce cuando hay una timina en la misma posición.

A diferencia del regulador RhIR, los cambios sencillos 11 y 12 favorecen la interacción del complejo LasR/3-O-C₁₂-HSL ya que la represión es mayor, pero si se introducen los cambios juntos, 11 (T→A)/ 12 (C→T) se observa que el complejo LasR/3-O-C₁₂-HSL ya no se une. Los resultados nos permiten decir que las

diferentes bases desempeñan un papel en la selectividad de unión por una proteína; es decir, que la conformación de un regulador transcripcional podría verse afectada por la secuencia de ADN específica a la que está unido.

Para determinar si el comportamiento observado en los ensayos de unión de los reguladores LasR y RhIR es el mismo con respecto a los niveles de transcripción, se realizaron fusiones transcripcionales *lacZ* para el promotor de *rhIA*, *lecA* y para las mutantes sencillas y dobles sobre la caja las de *rhIA* y se midió la actividad de β -galactosidasa en *E. coli*. Los resultados sugieren que en *E. coli*, el mayor cambio se da en la posición 8 (A \rightarrow T) de la caja las del promotor de *rhIA*, ya que sólo se activa un 10% con respecto al promotor silvestre, en concordancia con lo encontrado en los ensayos de unión. Un comportamiento similar sucede para las mutantes dobles 8(A \rightarrow T)/11(T \rightarrow A) o 8(A \rightarrow T)/12(C \rightarrow T); esta observación muestra que la Adenina en la posición 8 es esencial para que RhIR interaccione con el DNA y active el promotor, en el caso del cambio 11(T \rightarrow A) se observa una activación del 45%, este dato no correlaciona con el ensayo de unión, donde rhIR se une en presencia o ausencia del autoinductor casi en los mismos niveles que el promotor silvestre. Una explicación a esto pudiera ser que la conformación que adquiere rhIR/C4-HSL al DNA con este cambio afectará la interacción con la RNA polimerasa disminuyendo la activación del promotor. Por otro lado, los niveles de activación para la mutante sencilla 12(C \rightarrow T) y la mutante doble 11 (T \rightarrow A)/ (12 C \rightarrow T) son semejantes a los niveles del promotor silvestre. Una posible explicación del porqué no se ve afectada la doble mutante 11 (T \rightarrow A)/ (12 C \rightarrow T) es porque el cambio en posición 12 llega a ser compensatorio. Sin embargo, ninguna de las mutaciones es activada por el

complejo LasR/3-O-C₁₂-HSL a pesar de que los datos de unión sugieren que las mutaciones sencillas en las posiciones 11 y 12, sí se les une.

Para determinar si los patrones de transcripción en *E. coli* eran semejantes en *P. aeruginosa* PAO1, construimos las diferentes fusiones transcripcionales para los promotores de los genes *rhIA*, *lecA*, los cambios sencillos 8 (A→T), 11 (T→A) y 12(C→T), dobles: 8(A→T)/11(T→A), 8(A→T)/12(C→T) 11 (T→A)/(12 C→T) para las cajas *las* de *rhIA* y evaluamos la actividad de β-galactosidasa en la cepa PAO1 y comparamos estos niveles con los obtenidos en las mutantes $\Delta rhIR$ y $\Delta lasIrhII$; esta última fue evaluada en presencia de 3-O-C₁₂-HSL o 3-O-C₁₂-HSL más C₄-HSL. Los resultados sugieren que en *Pseudomonas aeruginosa*, ambos promotores *rhIA* y *lecA* son activados por RhIR/C₄-HSL y esta activación es más fuerte con el promotor de *rhIA*. Adicionalmente a lo anterior, nuestros datos sugieren que LasR/3-O-C₁₂-HSL contribuye en una pequeña parte en la expresión del promotor silvestre de *rhIA* pero no tiene un efecto cuando las posiciones 8, 11 y 12 de la caja *las* son cambiadas, a pesar que los ensayos de unión sugieren que LasR/3-O-C₁₂-HSL se une. El mayor efecto se tiene con la mutación sencilla 8(A→T) y la doble 8(A→T) /11(T→A) donde sólo se tiene una activación del 40 y 15%, respectivamente comparada con la secuencia silvestre. Estos datos coinciden con los datos obtenidos en *E. coli* y en los datos de unión y al menos en el caso de la posición 8 correlaciona con el consenso propuesto por Whiteley et al., 1999. En comparación del cambio en la posición 8 donde la actividad es del 35% el cambio en la posición 12 (C→T) no tiene efecto. Cuando evaluamos las mutantes dobles 8(A→T)/12(C→T) o 11 (T→A)/(12 C→T) se observó que la actividad es mayor para la doble mutación 8(A→T)/12(C→T) con respecto a la

sencilla 8(A→T) y en el caso de 11 (T→A)/12(C→T) los niveles de activación son comparables a los de la secuencia silvestre; lo que nos sugiere que el cambio en la posición 12 compensa el efecto del cambio en la posición 8 y 11, de alguna manera la conformación que adquiere rhIR-C4-HSL al DNA con este cambio favorece la interacción con la RNA polimerasa y este cambio se ve reflejado en la activación del promotor. Cuando se evaluó el promotor *rhIA* y sus variantes en la doble mutante $\Delta lasRhII$ y se complementan adicionando los dos autoinductores 3-O-C₁₂-HSL y C₄-HSL solo el promotor con la secuencia silvestre se restaura en los mismos niveles que en la cepa parental.

Nuestros datos nos sugieren que la especificidad de la unión al ADN y la activación de la transcripción génica por parte de los reguladores RhIR y LasR de Quórum Sensing es compleja.

12 CONCLUSIONES

Estos datos nos sugieren que:

- La construcción del promotor artificial que hemos hecho nos permite detectar la unión específica de los reguladores LasR y RhIR de *P. aeruginosa* a sus secuencias blanco de DNA (cajas *las*).
- RhIR se une a la caja *las* de *rhIA* en ausencia o en presencia de C₄-HSL mientras que sólo reconoce la caja de *lecA* cuando el autoinductor está presente.
- El cambio de la Adenina por Timina en la posición 8 en la caja *las* del promotor *rhIA*, afecta considerablemente en la unión de RhIR al DNA como

en los niveles transcripcionales en *E. coli* como en *Pseudomonas aeruginosa*, por lo que es indispensable.

- Los cambios en la posición 11 (T→A) y 12 (C→T) favorecen la unión de LasR/3-O-C₁₂-HSL al DNA, pero esta aparente unión no es capaz de activar la expresión transcripcional en *E. coli*

-

13 PERSPECTIVAS

Estudiar cambios en otras posiciones de las cajas las que son reguladas por RhlR o LasR como la caja de lecA .

14 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Pace NR. (1997) A molecular view of microbial diversity and biosphere. *Science* 276 (5313): 734-40.
2. Green Sk, SchrothMN; Cho JJ. Kominos SK, Vitanza-Jack VB (1974) Agricultural plants and soil as a reservoir. *Pseudomonas aeruginosa Appl. Microbiol.* 28: 987-991.
3. Dantas, G., Sommer MO., Oluwasegun R, Church GM (2008) Bacterial subsisting on antibiotics. *Science* 320: 100-103.
4. Vento S, Cainelli F, Temesgen Z (2008) Lung infections after cáncer chemotherapy. *Lancet Oncol* 9:982-992.
5. Rahme LG, Tan MW, Le L, Wong SM, Tompkins RG., Calderwood SB, Ausbel FM. (1997). Use of model plant host to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Aca Sci USA* 94:13245-13250.
6. Clatworthy AE., Lee JS., Leibman M, Kostun Z., Davidson AJ, Hung DT (2009) *Pseudomonas aeruginosa* infection of *zabrafish* involves both host and pathogen determinant. *Infect Immun.* 77:1293-303.

7. Collin BA., Leather HL, Wingrad JR, Ramphal R (2001) Evolution, incidence, and susceptibility of bacterial bloodstream isolates from 519 bone marrow transplant patients. *Clin infect Dis* 33: 947-953
8. 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* 48:4604-4610.
9. Davies JC (2002) *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Pathogenesis and persistence. *Paediatr Respir Rev.* 3:128-134.
10. Stover *et.al.* (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959-964.
11. 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
12. Rahme LG., Stevens EJ., Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG., Ausbel FM. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268: 1899-1902.
13. Kung VL. Ozer EA, Hauser AR (2014) Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* *Microbial Mol Biol Rev.* 74: 621-641.
14. Ramos JL (2011) *Pseudomonas* Vol 2. Virulence and Gene Regulation. New York Kluwer Academic Plenum Publishers.
15. 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. *Bacteriol* 176:6677-6687.
16. Wieland CW, Stegmund 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: 1352-1358.

17. Mewe MI, Tielker D, Shonberg cilia. J Lar R, Schachner M, Jaeger KE, Shumacher U (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectins I y II and their interaction with human airway cilia. *J. Laryngol Otol* 119: 595-599.
18. Duong F, Bonnet E, Geli V, Lazdunski A, Murgier M. Filloux (2001) The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: a new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene* 262:147-153.
19. Ball G, Durand E, Lazdunski A, Filloux A. (2002) A novel type II protein secretion. *Mol Microbiol.* 143: 475-485
20. Cornelis GR The type III secretion Injectisome (2010) *Nat Rev Microbiol* 4: 811-825.
21. 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 enviromental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl. Aca. Sci. USA* 100:8484-8489.
22. Diggle, S.P. and Marvin Whiteley. (2020) Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology.* 166(1):30-33.
23. 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* 5:8842.
24. Abdel-Mawgoud AMI, Lépine F, Deziel E. (2010) Rhamnolipids diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl. Microbiol Biotechnol* 86:1323-1336
25. Jensen PO, Bjarnsholt T, Phipps R, Rasmussen TB, Calum H, Christoffersen L, Moser C, Williams P, Pessler T, Givskov M, Hoiby N (2007) Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 153:1329-1338.
26. Van Gennip M, Christensen LD, Alhede M, Phipps R, Jensen PO, Christoffersen L, Pamp SJ, Moser C, Mikkelsen PJ, Koh AY, Tolker-Nielsen T. Pier GB, Hoiby N, Givskov M, Bjarnsholt T (2009) Inactivation of the *rhlA*

- gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipids production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *APMIS* 117: 537-46.
27. O'Malley YQ, Rezka KJ, Spitz DR, Denning GM, Britigan BE. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly glutathione and decreases its levels in airway epithelial cell. *Am J. Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287:94-103.
 28. Gallagher LA, Manoil C. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J Bacteriol.* 183(21):6207-14.
 29. Blumer C, Hass D. (2000) Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch. Microbiol* 173: 170-177.
 30. Clement E, Mesini PJ, Pattus F, Schalk IJ (2004) The binding mechanism of pyoverdine with the outer membrane membrane receptor *FpvA* in *Pseudomonas aeruginosa* is depended on its iron loaded status. *Biochemistry* 43: 7954-7965.
 31. Shirley M. Lamont IL. (2009) Role of Ton B in pioverdine mediated signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriology* 191: 5634-5640.
 32. Fuqua WC, Winans SC, Greenber EP (1994) Quorum sensing in bacteria. The LuxR-LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269-275.
 33. He Y. W, L.H. Zhang (2008) "Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*, *FEMS. Microbiology Reviews* 32(5): 842-857.
 34. Nealson KH (1977) Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significase. *Arch Microbiol* 112:73-79.
 35. Nealson KH, Platt T, Hasting JW (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol* 104: 313-322.
 36. Ruby EG. (1996) Lessons from a cooperative bacterial animal association: the *Vibrio fhiseri Euprymna scolopes* light organs simbiosis. *Ann Rev Microbiol* 50: 591-624.

37. Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP (2001) Regulation of gene expression by cell to-cell communication acyl-homoserine lactone quorum sensin. *Ann. Rev. Genet* 35:439-468.
38. Martinez Antonio, A. y Soberón Chávez, G. 2002. Ciencias. Enero-Marzo:60-66.
39. He YW, Zhang LH. Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. (2008) *FEMS Microbiol Rev.* 2008 32(5):842-57.
40. Devine J. H., Shadel, G. S. and Baldwin T. O. 1989. Identification of the operator of the lux regulon of the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:5688-5692.
41. Shadel, G. S., and Baldwin, T. O. 1991. The *Vibrio fischeri* Lux protein is capable of bidirectional stimulation of transcription and both positive and negative regulation of the *luxR* gene. *J. Bacteriol.* 173:568-574.
42. Choi SH. Greenberg EP (1985) Genetic dissection of DNA binding and luminiscence gene activation the *Vibrio fisheri* LuxR Protein. *J. Bacteriol* 174:4064-4069.
43. Churchill, M.E. A. y Chen L. (2008) "Structural Basis of Acyl-homoserine Lactone-Dependent Signaling" *Grow (Lakeland)*, 23 (1). pp. 1-7.
44. Williams P, Winzer K, Chan WC, Cámara M. (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 29;362(1483):1119-34.
45. Van Delden, C. and B. H. Iglewski. 1998 *Cell-to-cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. Emerg. Infect. Dis.* 4: 551-560.
46. Wagner, E. V., D. Bushnell, L. Passador, A. I. Brooks and B. H. Iglewski. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* 185: 2080-2095.
47. Pesci EC. Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BJ (1999) Quinolone signaling in the cell to cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:11229-11234.

48. Shuster 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.
49. Passador L., et al. (1993). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260(5111):1127-1131.
50. Kiratisin, P., Tucker, K. D., y Passador, L. (2002). LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. *Journal of bacteriology*, 184(17):4912–4919.
51. Seed PC, Passador L, Iglewski BH. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J Bacteriol*. 1995 Feb;177(3):654-9
52. de Kievit TR, Kakai Y, Register JK, Pesci EC, Iglewski BH. (2002). Role of the *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in rhlII regulation. *FEMS Microbiol Lett* 18;212(1):101-6.
53. Medina, G., K. Juárez, R. Díaz and G. Soberón-Chávez. 2003a. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR encoding a quorum sensing regulatory protein. *Microbiol.-UK*. 149: 3073-3081.
54. 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 USA* 98:14613-14618.
55. Dubern JF, Diggle SP. (2008). Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst*. 4(9):882-8.
56. 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 (Reading)*. 157(Pt 9):2545-2555.

57. Grosso-Becerra MV, Santos-Medellín C, González-Valdez A, Méndez JL, Delgado G, Morales-Espinosa R, Servín-González L, Alcaraz LD, Soberón-Chávez G. (2014) *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BMC Genomics*. 28; 15:318.
58. Rampioni G, Bertani I, Zennaro E, Polticelli F, Venturi V, Leoni L (2006) The quorum sensing negative regulator RsaI of *Pseudomonas aeruginosa* binds to the *lasI* promoter. *J Bacteriol*. 188:815-819.
59. Rampioni G, Shuster 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.
60. Brint, J. M. and Ohman, D. E. 1995. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol*. 177: 7155-7163.
61. Rust, L., E. C. Pesci and B. H. Iglewski. 1996. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) regulatory region. *J. Bacteriol*. 178: 1134-1140.
62. Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS. (2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol*. 183(21):6454-65.
63. Pessi, G. and D. Haas. 2000. Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum sensing regulators LasR and RhIR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. 182: 6940-6949.
64. Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Camara 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.

65. Pesci, E. C., J. B. Milbank, J. P. Pearson, S. McKnight, A. S. Kende, E. P. Greenberg and B. H. Iglewski. 1999. Quinolone signaling in the cell to cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 11229-11234.
66. Gallagher LA, McKnight SL. Kuznetsova MS, Pesci EC. Manoil C (2002) Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184: 6472-6480.
67. Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, Coleman JP, Pesci EC. (2005) Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 187(13):4372-80.
68. Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A. P., Lépine, F., Padfield, K. E., Saucier, M., Xiao, G. y Rahme, G. (2005) "The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: Multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones", *Molecular Microbiology*, 55(4), pp. 998–1014.
69. Xiao G, He J Rahme LG (2006) Mutation analysis of *Pseudomonas aeruginosa mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum sensing circuitry. *Microbiology* 184:1679-1986.
70. 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.
71. Drees SL, Fetzner S. (2015) PqsE of *Pseudomonas aeruginosa* Acts as Pathway-Specific Thioesterase in the Biosynthesis of Alkylquinolone Signaling Molecules. *Chem Biol*. 22(5):611-8.
72. De Kievit, T. R., Y. Kakai, K. Register, E. C. Pesci and B.H. Iglewski. 2002. Role of the *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* systems in *rhlI* regulation. *FEMS Microbiol. Lett*. 212: 101-106.

73. Pearson, J. P., E. C. Pesci and B. H. Iglewski. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis. *J. Bacteriol.* 179: 5756-5767.
74. Dekimpe V, Déziel E. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhIR regulates LasR-specific factors. (2009). *Microbiology (Reading)*. 155(Pt 3):712-723.
75. Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP (1999) Identification of gene controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:9839-9843.
76. McGrath S, Wade DS, Pesci EC. (2004) Dueling quorum sensing system in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) *FEMS Microbiol Lett* 230:27-34
77. Brouwer S, Pustelny C, Ritter C, Klinkert B, Narberhaus F, Häussler S. The PqsR and RhIR transcriptional regulators determine the level of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* by producing two different pqsABCDE mRNA isoforms. (2014) *J Bacteriol.* 196(23):4163-71.
78. García-Reyes S, Soberón-Chávez G, Cocotl-Yanez M. The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. (2020) *J Med Microbiol.* 69(1):25-34.
79. Whiteley M, Parsek MR, Greenberg EP (2000) Regulation of quorum sensing by RpoS in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182: 4356-4360.
80. Shuster M, Hawkins AC, Harwood CS, Greenberg EP (2004) The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Mol Microbiol.* 51: 973-985.
81. Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams p, Lazdunski A (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary sigma factor RpoS. *Mol Microbiol.* 21:1137-1146.
82. Miller MB, Bassler BL. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 55:165-99.

83. Kiratisin P, Tucker KD, Passador L. LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as a multimer. (2002) *J Bacteriol.* 84(17):4912-9.
84. Medina, G., K. Juárez, B. Valderrama and G. Soberón-Chávez. 2003c. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J. Bacteriol.* 185: 5976-5983.
85. Schuster M, Urbanowski ML, Greenberg EP. Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 101(45):15833-9.
86. Medina, G., K. Juárez, B. Valderrama and G. Soberón-Chávez. 2003c. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J. Bacteriol.* 185: 5976-5983.
87. Rahim, R., U. Ochsner, C. Olvera, M. Graninger, P. Messner, J. S. Lam and G. Soberón-Chávez. 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlC* gene that encodes rhamnosyl transferase-2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 40: 708-718.
88. Marisela Aguirre-Ramírez, Gerardo Medina, Abigail González-Valdez, Victoria Grosso-Becerra and Gloria Soberón-Chávez. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* *rmIBDAC* operon, encoding d TDP-L rhamnose biosynthetic enzymes, is quórum-sensing regulated. *Microbiology.* (2012) 158:908-16.
89. Lixa C, Marques AF, Cortines JR, Neves BC, Oliveira DM, Anobom CD, Lima LM, Pinheiro AS. (2016) Refolding, purification, and preliminary structural characterization of the DNA-binding domain of the quorum sensing receptor RhlR from *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Expr Purif.* 121:31-40.
90. McCready AR, Paczkowski JE, Cong JP, Bassler BL. An autoinducer-independent RhlR quorum-sensing receptor enables analysis of RhlR regulation. (2019) *PLoS Pathog.* 13;15(6):e1007820

91. Soberón-Chávez, G., Aguirre-Ramirez, M., Ordóñez, L. 2005. Is *Pseudomonas aeruginosa* only "Sensing Quorum". *Critical Reviews in Microbiology*. 31:171-182.
92. Schuster M, Greenberg EP. Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. (2007) *BMC Genomics*. 22;8:287
93. Schuster, M., C. P. Lostroh, T. Ogi and E. P. Greenberg. 2003. Identification, timing and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* 185: 2066-2079.
94. Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP. (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23;96(24):13904-9.
95. Whiteley M, Greenberg EP. (2001) Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J Bacteriol* 183(19):5529-34.
96. Anderson, R. M., C. A. Zimprich and L. Rust. 1999. A second operator is involved in *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) activation. *J. Bacteriol.* 181: 6264-6270.
97. Rust L, Pesci EC, Iglewski BH. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) regulatory region. *J Bacteriol.* 1996 178(4):1134-40.
98. Eglund, K. A. and E. P. Greenberg. 2000. Conversion of the *Vibrio fischeri* transcriptional activator LuxR to a repressor. *J. Bacteriol.* 182: 805-811.
99. Von Bodman, Susanne B., K. Ball, Jessica; Faini, Marie A., Herrera, Carmen M., Minogue, Timothy D., Urbanowki, Mark L. and Stevens, Ann M. 2003. The Quorum Sensing Negative Regulators EsaR and ExpREcc, Homologues within the LuxR Family, Retain the Ability To Function as Actiators of Transcription. *J. Bacteriol.* 185:7001-7007.
100. Simons RW, Houman F, Kleckner N. Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. (1987) *Gene*.;53(1):85-96.

101. Elliott T. A (1992) method for constructing single-copy lac fusions in *Salmonella typhimurium* and its application to the hemA-prfA operon. *J Bacteriol.* 174(1):245-53.
102. Casadaban MJ, Cohen SN. (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(9):4530-3.
103. Miller, J. H. (1972) "Experiments in molecular genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 433, pp. 352–355.
104. Spaink, H., Okker, R., Wijffelman, C., Pees, E. & Lugtenberg, B. (1987). Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1Jl. *Plant Mol Biol* 9: 27–39.
105. Preston MJ, Seed PC, Toder DS, Iglewski BH, Ohman DE, Gustin JK, Goldberg JB, Pier GB. Contribution of proteases and LasR to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infections. *Infect Immun.* 1997 Aug;65(8):3086-90
106. Stevens, A. M., Dolan, K. M., and Greenberg, E. P. 1994. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91:1619-12623.
107. Gray, K. M., L. Passador, B. H. Iglewski and E. P. Greenberg. 1994. Interchangeability of components from the quorum-sensing regulatory systems of *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 176: 3076-3080.

The effect of specific *rhIA*-las-box mutations on DNA binding and gene activation by *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcriptional regulators RhlR and LasR

Abigail González-Valdez¹, Luis Servín-González¹, Katy Juárez², Alberto Hernandez-Aligio² & Gloria Soberón-Chávez¹

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, México; and ²Departamento de Ingeniería Celular y Biotatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, México

Correspondence: Gloria Soberón-Chávez, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Apdo Postal 70228, México 04510, México.
Tel.: +52 55 56229202;
fax: +52 55 55506447;
e-mail: gloria@biomedicas.unam.mx

Received 17 May 2014; revised 5 June 2014; accepted 7 June 2014. Final version published online July 2014.

DOI: 10.1111/1574-6968.12505

Editor: Craig Winstanley

Keywords

consensus-sequences; protein-DNA-interaction; las-box-mutations.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a free-living bacterium and an important opportunistic pathogen. The genes coding for virulence-associated traits are regulated at the level of transcription by the quorum-sensing response. In this response, the regulator LasR coupled with the autoinducer 3-oxo-dodecanoyl homoserine lactone (3O-C12-HSL) activates transcription of genes for several virulence factors. LasR/3O-C12-HSL also activates transcription of *rhlR*, the gene coding for the transcriptional regulator RhlR, and of *rhlI* that encodes the synthase that produces the autoinducer butanoyl-homoserine lactone (C4-HSL) that interacts with RhlR. Genes activated by RhlR/C4-HSL include those involved in rhamnolipids production (like the *rhlAB* operon) and *lecA*, coding for PA-I lectin. The molecular basis of LasR/3O-C12-HSL- and RhlR/C4-HSL-DNA-binding specificity (at the so-called las-boxes) has not been clearly determined, and the aim of this work was to contribute to its understanding. Therefore, we analyzed the interaction of LasR and RhlR to variants of the *rhIA*-las-box that were constructed based on the comparison of this las-box to the las-box of *lecA*. We conclude that LasR and RhlR DNA-binding specificity is a complex multifactorial phenomenon in which both positive and negative effects are involved and that binding of these proteins does not necessarily result in gene activation.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a free-living γ -proteobacterium, but also an opportunistic human pathogen (Driscoll *et al.*, 2007); the production and secretion of virulence-associated traits at the transcriptional level is regulated by the so-called quorum-sensing response (QSR), which is mediated by the *P. aeruginosa*-produced autoinducers (mainly 3-oxo-dodecanoyl-homoserine lactone [3O-C12-HSL] and butanoyl-homoserine lactone [C4-HSL]) that interact with LasR and RhlR transcriptional regulators (Williams & Cámara, 2009).

Some genes coding for different virulence factors are activated by RhlR/C4-HSL, among which are pyocyanin, lectin PA-IL (encoded by the *lecA* gene), and the bio-surfactants rhamnolipids (Williams & Cámara, 2009).

The *rhlAB* operon encodes the enzymes involved in the production of rhamnolipids (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). The expression of the *rhlABR* operon plays a central role in the regulation of the QSR (Croda-García *et al.*, 2011; Wenner *et al.*, 2014; M.V. Grosso-Becerra, G. Croda-García, E. Merino, L. Servín-González, R. Mojica-Espinosa & G. Soberón-Chávez, unpublished data 2014).

RhlR or LasR bind to las-boxes to regulate transcription with different binding affinities (Whiteley & Greenberg, 2001; Soberón-Chávez *et al.*, 2005). The particular sequence of each las-box determines whether LasR, RhlR, or both regulatory proteins regulate a gene, but the basis for this specificity is not fully understood (Whiteley & Greenberg, 2001; De Kievit *et al.*, 2002; Schuster & Greenberg, 2007). Genes that can be regulated either by

RhlR or by LasR have the las-boxes with the sequence (N)₂CT(N)₃A(N)₄T(N)₃AG(N)₂ (Whiteley *et al.*, 1999). Using an *in silico* approach, the consensus RhlR-specific sequence (N)₂CTNCCAG(N)₂TTNGNAGN (nucleotides in bold type are invariable) was proposed (rhl-box; Schuster & Greenberg, 2007).

The 5' untranslated region (5'-UTR) of the *rmlBDAC* operon that encodes the enzymes that convert glucose-1-phosphate to TDP-L-rhamnose (the substrate for the synthesis of rhamnolipids) contains a sequence where RhlR binds specifically (rhl-box), both in the presence and in the absence of C4-HSL; this rhl-box has the sequence: ACCTACCAGATCTGGGGTTG (Aguirre-Ramírez *et al.*, 2012). Thus, the *rmlB*-rhl-box lacks the A at position 17 and the G at position 18 that was proposed to be invariable for las-boxes (Whiteley & Greenberg, 2001). These results show that the dinucleotide AG at positions 17 and 18 is fundamental for LasR/3O-C12-HSL DNA binding, but not for binding of RhlR/C4-HSL, and is the only part of the binding sequence that has been shown to determine RhlR vs. LasR DNA-binding specificity.

The aim of this work was to determine the role in RhlR and LasR DNA-binding specificity, of some positions in the las-boxes present in the promoter regions of two genes activated by RhlR/C4-HSL, *rhlA* (Medina *et al.*, 2003b), and *lecA* (Winzer *et al.*, 2000). The rationale of this study was that, as both the *rhlA* and *lecA* genes are activated by RhlR/C4-HSL, but contain different nucleotides in some positions (8, 11 and 12, among others; Table 1), these positions should not participate in determining DNA-binding specificity of RhlR vs. LasR or in differential transcriptional activation by these regulators. We made single-, double- and triple-point mutations in the *rhlA*-las-box, changing the nucleotides for the ones present in the *lecA*-las-box, and measured DNA

binding of RhlR and LasR, with or without their cognate autoinducers and the expression of the genes that contain those mutations, both in *Escherichia coli* and in *P. aeruginosa*.

The results presented in this work show that some positions in the las-boxes that were considered *a priori* not to participate in the selective recognition by LasR/3O-C12-HSL and RhlR have a role in this process and that the binding of any of the two transcriptional regulators studied (LasR or RhlR) does not necessarily lead to transcriptional activation.

Materials and methods

Microbiological procedures

The bacterial strains and plasmids used in this work are shown in Supporting Information, Table S1. *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* strains were routinely grown at 37 °C with shaking (225 r.p.m.) on LB (Miller, 1972) or PPGAS (Zhang & Miller, 1992) media. When required, antibiotics were used in selective media at the following concentrations (µg mL⁻¹) for *E. coli*: tetracycline (Tc) 30 and ampicillin (Am) 200, and for *P. aeruginosa*: carbenicillin (Cb) 200 and gentamicin (Gm) 150. The data showing β-galactosidase activity represent the mean of at least three independent experiments, each performed in duplicate.

Nucleic acid procedures

DNA manipulations were carried out as reported by Sambrook & Russell (2001). Oligonucleotide synthesis and DNA sequencing were performed at the facilities of the Instituto de Biotecnología, UNAM. The sequences of the oligonucleotides used in this work are shown in Table S3.

Table 1. Characteristics of las-box sequence variants that were studied in this work

Gene	las-box sequence	Protein activator	Protein binding*
<i>rhlA</i>	TCCTGTGAAATCTGGCAGTT	RhlR	RhlR*
<i>rhlAA8T</i>	TCCTGTG TA ATCTGGCAGTT	RhlR	RhlR
<i>rhlAT11A</i>	TCCTGTGAAA ACT GGCAGTT	RhlR	RhlR/LasR*
<i>rhlAC12T</i>	TCCTGTGAA ATT GGCAGTT	RhlR	RhlR/LasR*
<i>rhlAA8T/T11A</i>	TCCTGTGTAA ACT GGCAGTT	RhlR	RhlR
<i>rhlAA8T/C12T</i>	TCCTGTG TA ATTGGCAGTT	RhlR	RhlR
<i>rhlAT11A/C12T</i>	TCCTGTGAAA ATT GGCAGTT	RhlR	RhlR
<i>rhlA A8T/T11A/C12T</i>	TCCTGTGTAA ATT GGCAGTT	None	None
<i>lecA</i>	TCCTGCAT GA ATTGGT AGGC	RhlR	RhlR/LasR*
<i>lasI</i>	ATCTATCTCATTGGCTAGTT	LasR	LasR*

Nucleotides in italics correspond to positions that have been proposed to be invariant in RhlR DNA-binding sequences (Schuster & Greenberg, 2007). Nucleotides marked in boldface show mutations in the *rhlA*-las-box that were evaluated in this work. Underlined nucleotides in the *lecA*-las-box represent differences between its sequence and that of the *rhlA* 8/11/12 triple mutant.

*Protein binding to these DNA sequences was determined *in vivo* (Table 2) and *in vitro* by electrophoretic mobility shift assay (EMSA, Fig. 2).

Restriction sites were added at the 5' ends of primers to facilitate the cloning of the PCR products.

Plasmids construction

A fragment corresponding to the promoter region of *rhlA* (nucleotides –476 to +80) was amplified by PCR using PAO1 genomic DNA as the template and using the primers Frh1A and Rrh1A (Table S3). The resulting fragment was cloned into pJET1.2/blunt in accordance with the manufacturer's instructions (Thermo Scientific), generating plasmid pJrh1Anft-3 (Table S1).

For construction of plasmid pMPrh1A (Table S1), the promoter region of *rhlA* was excised by digestion with EcoRI and PstI from plasmid pJrh1Anft-3 (Table S1) and cloned into the same restriction sites of promoterless vector pMP220 (Spaink *et al.*, 1987) to generate a transcriptional fusion to the *lacZ* gene. Plasmid pLPrh1A (Table S1) was constructed by ligating a 570 pb XhoI–EcoRI fragment from plasmid pJrh1A (Table S1) and cloned into the same restriction sites of vector pLP170 (Preston *et al.*, 1997) to generate a transcriptional fusion to the *lacZ* gene.

Site-directed mutagenesis

To generate plasmids with mutations (Table S1), we used the Quik Change XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's instructions. Plasmid pJrh1Anft-3 was used as the template, and the mutagenesis was performed with the primers listed in Table S3. After verification of the DNA sequences, each variant was subcloned in plasmid pMP220 (Spaink *et al.*, 1987) and pLP170 (Preston *et al.*, 1997) vector.

In vivo determination of RhIR and LasR DNA-binding ability

To measure RhIR and LasR DNA-binding ability to different las-box sequences, we used the *in vivo* procedure described previously (Croda-García *et al.*, 2011), which consisted of driving *lacZ* transcription from artificial promoters with consensus 35 and 10 sequences with the different las-boxes cloned between these two regions. To construct the hybrid artificial promoters of all sequences analyzed, we used complementary oligonucleotides (Table S3) that upon annealing produced fragments flanked by EcoRI, and BamHI was then ligated into EcoRI–BamHI-digested pR551 (Simons *et al.*, 1987) to produce transcriptional *lacZ* fusions. These were introduced into the *E. coli* TE2680 chromosome by the method described previously (Simons *et al.*, 1987; Elliott, 1992). P1_{vir} transduc-

tion was used to move promoter fusions from the chromosome of TE2680 to the chromosome of MC4100 (Casadaban, 1976) or the *sdhA* mutant (Baba *et al.*, 2006). The ability of RhIR with or without C4-HSL or LasR/3O-C12-HSL to bind to the different DNA sequences studied (Table 1) was determined by the percentage of repression of β -galactosidase activity in the presence of these proteins expressed from a plasmid pGMYC for RhIR or pMT1 for LasR (Medina *et al.*, 2003a, b) and autoinducers, compared with the activity of this enzyme with the empty pUCP20 vector.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs)

A total of 622-bp fragments of the regulatory region of *rhlA*, *rhlA*-C12T, or *rhlA*-T11A/C12T were PCR-amplified. Fragments of the regulatory regions of *lecA* (508 bp) and *lasI* (198 bp) were amplified from *P. aeruginosa* chromosomal DNA by PCR with the primer pairs FleCA-K/RlecA-P and *prolasIf/prolasIr* (Table S3), respectively. A fragment containing the regulatory region of the GUS303 gene of *Geobacter sulfurreducens*, used as a negative control in the DNA-binding reactions, was also obtained by PCR from *G. sulfurreducens* DNA with the primer pair IG_303F/IG_303R (Table S3). Binding reactions were performed by mixing 0.5 ng of each PCR product labeled with (γ -³²P)- δ ATP and increasing concentrations of extract protein, in a total volume of 20 μ L of binding buffer, which contained 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 5% (vol/vol) glycerol, 10 μ g μ L⁻¹ BSA, and 0.2 μ g poly (dI-dC). For protein–DNA interaction, the samples were incubated at room temperature for 30 min and then separated by electrophoresis in 6% nondenaturing polyacrylamide gels in 0.5 \times Tris-borate-EDTA buffer at room temperature.

Results and discussion

Determination of the 'apparent DNA-binding ability' (ADBA) of RhIR and LasR

We determined the ability of RhIR or LasR to interact with DNA *in vivo* by measuring the repression of an artificial *lacZ* fusion that contains in its promoter either the wild-type *rhlA*-las-box or its derived single-, double- and triple-point mutations (Table 1) flanked by the consensus 10 and 35 RNA-polymerase-binding sequences.

While this measurement is not a quantitative estimate of the DNA-binding capabilities obtained *in vitro* with purified proteins, the results presented here and reported previously (Croda-García *et al.*, 2011; Aguirre-Ramirez *et al.*, 2012) show that these assays have a high degree of correlation with all the measurements of RhIR and LasR

binding to DNA, which have been reported using other approaches (Soberón-Chávez *et al.*, 2005; Williams & Cámara, 2009). We refer to the percentage of repression of *lacZ* transcription driven by the described artificial promoters by either RhlR or LasR, as their ‘apparent DNA-binding ability’ (ADBA).

The A at position 8 is conserved in the *las*-boxes of the great majority of RhlR-activated genes, but is absent in the *lecA*-*las*-box that has a T. This position has been implicated in determining DNA-binding specificity (Whiteley & Greenberg, 2001).

Using this assay, we found that the change of position 8 of the *rhlA*-*las*-box from A to T causes a reduction in the ADBA of RhlR with or without C4-HSL, as determined by the reduced percentage of repression of the *lacZ* fusion containing this mutation (Table 2). The reduced RhlR ADBA to the *las*-box sequences containing the A8T mutation was also seen when the double mutants A8T/T11A and A8T/C12T were analyzed (Table 2).

The triple A8T/T11A/C12T mutant is no longer recognized by RhlR, with or without C4-HSL, even though RhlR/C4-HSL is able to bind the *lecA*-*las*-box that contains the same nucleotides as the mutant at the corresponding 8, 11, and 12 positions (Table 2). This result shows that binding of RhlR/C4-HSL to *las*-boxes is a complex phenomenon that is not determined solely by the presence of certain nucleotides in each position.

It has been proposed that a G in position 9 is an invariable nucleotide in *las*-boxes, which are mainly recognized by RhlR (Schuster & Greenberg, 2007), but the *rhlA*-*las*-box is an exception, as it contains an A in position 9 (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). It is thus possible that the presence of an A in position 9, in combination with the mutations in positions 8, 11, and 12, renders the

rhlA-*las*-box triple mutant (A8T/T11A/C12T) nonfunctional for RhlR and LasR binding.

The *E. coli* chromosome codes for a LuxR homolog called SdiA that can interact with exogenously added autoinducers. Although the reported DNA-binding site for SdiA has a different sequence to the *las*-boxes studied in this work, it has been reported that this LuxR homolog might interfere with some *E. coli* biosensors that are based on the activity of some members of the LuxR family (Lindsay & Ahmer, 2005). To rule out any interference by SdiA in our *E. coli* system to measure ADBA, we transferred all the artificial promoters used to measure RhlR and LasR ADBA to a *sdiA* mutant (Table S1) and showed that the results obtained in the MC1 genetic background (Table 2) are not significantly different (Table S2).

Single mutations in positions 11 and 12 of the *rhlA*-*las*-box (T11A and C12T) allow the binding of LasR/3O-C12-HSL

The T at position 11 (which in the case of *lecA* is an A) and the C at position 12 (which is a T in the *lecA*-*las*-box) constitute a dinucleotide (TC), which is present in several *las*-boxes of genes activated by RhlR/C4-HSL, such as the *rhlAB* operon or by LasR/3-O-C12-HSL (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

We found that either *rhlA*-*las*-box mutations T11A or C12T caused that LasR/3O-C12-HSL gained the ability to bind to the mutant *las*-boxes, with a significant ADBA (Table 2). The gain of function phenotype of these two-point mutations suggests that the T and C nucleotides present in positions 11 and 12 of the *rhlA*-*las*-box have a negative effect on LasR/3O-C12-HSL binding. However,

Table 2. Apparent DNA-binding ability (ADAB) of QS transcriptional regulators RhlR and LasR to different *las*-box sequences, in the absence and presence of their cognate autoinducer*

	RhlR		LasR	
	−C ₄ -HSL (%)*	+C ₄ -HSL (%)*	−3OC ₁₂ -HSL (%)*	+3OC ₁₂ -HSL (%)*
ABI-rhlA [†]	50 (100)	50 (100)	NR	5 (7)
ABI-rhlA-A8T	20 (40)	27 (54)	NR	NR
ABI-rhlA-T11A	43 (86)	50 (100)	NR	31
ABI-rhlA-C12T	NR	35 (70)	NR	35
ABI-rhlA-A8T/T11A	6 (12)	22 (44)	NR	NR
ABI-rhlA-A8T/C12T	NR	32 (64)	NR	NR
ABI-rhlA-T11A/C12T	30 (60)	45 (90)	NR	NR
ABI-rhlA-A8T/T11A/CA12T	NR	NR	NR	NR
ABI- <i>lecA</i>	NR	50 (100)	NR	50 (71)
ABI- <i>lasI</i> [†]	NR	NR	NR	70 (100)

*DNA binding is expressed as percentage of inhibition of the expression of the artificial promoters containing the sequence to be evaluated between −10 and −35 RNA-polymerase-binding sequences, with respect to expression from pUCP20. RhlR was expressed from plasmid pGMYC and LasR from plasmid pMT1. The percentage shown in parenthesis was calculated taking as 100% the repression detected with ABI-rhlA in the case of RhlR, and ABI-*lasI* in the case of LasR. NR means no repression detected.

[†]Croda-García *et al.* (2011).

the *rhlA*-las-box double-mutant T11A/C12T, that contains the AT dinucleotide, is not bound by LasR/3O-C12-HSL (Table 2), showing again the complex nature of the interaction of LasR/3O-C12-HSL and DNA.

In addition, we found that the *rhlA*-las-box mutant C12T is no longer bound by RhIR in the absence of C4-HSL. This is similar to the way that RhIR interacts with the *lecA*-las-box (Table 2), but differs with the reported ability of this protein to interact with the *rhlA*- and *rmlB*-las-boxes in the absence of this autoinducer (Medina *et al.*, 2003b; Aguirre-Ramírez *et al.*, 2012). As both the *rhlA*- and the *rmlB*-las-boxes contain a C in position 12, it is possible that RhIR without autoinducer only binds to las-boxes that contain a C in position 12, and not to those containing a T in this position, while RhIR/C4-HSL can interact with las-boxes containing either of these nucleotides in position 12.

We found that LasR/3O-C12-HSL is able to bind the *lecA*-las-box with a high ADBA (Table 2), although it has been reported that the transcription of this gene is only activated by RhIR/C4-HSL and not by LasR/3O-C12-HSL in the *P. aeruginosa* background (Winzer *et al.*, 2000).

To confirm the results obtained using the *in vivo* DNA-binding assay, we performed *in vitro* electrophoretic

mobility shift assay (EMSA) using cell-free extracts of *E. coli* that expressed RhIR or LasR in the presence of C4-HSL or 3O-C12-HSL, respectively (Fig. 1). In the case of the *rhlA*-las-box mutants, the results of *in vitro* experiments using fragments that contain the single C12T or the double T11A/C12T double mutants are shown. These experiments show similar results to those obtained with the *in vivo* assay for DNA binding (Fig. 1, Table 2), as we found that LasR/3O-C12-HSL shows an increased DNA binding to the *rhlA*-las-box with the C12T mutation (Fig. 1), which is reduced with the T11A/C12T double mutant (Fig. 1). In the EMSA experiment, we found that LasR/3O-C12-HSL is still able to bind the T11A/C12T double mutant, although with a reduced affinity as judged by the lack of interaction of this protein at the lower protein concentrations used (Supporting Information, Fig. S1 a–v).

Expression in *E. coli* of transcriptional *rhlA*-*lacZ* fusions, with point mutations in the *rhlA*-las-box

To determine whether the phenotype of different *rhlA*-las-box mutants with respect to the binding of RhIR

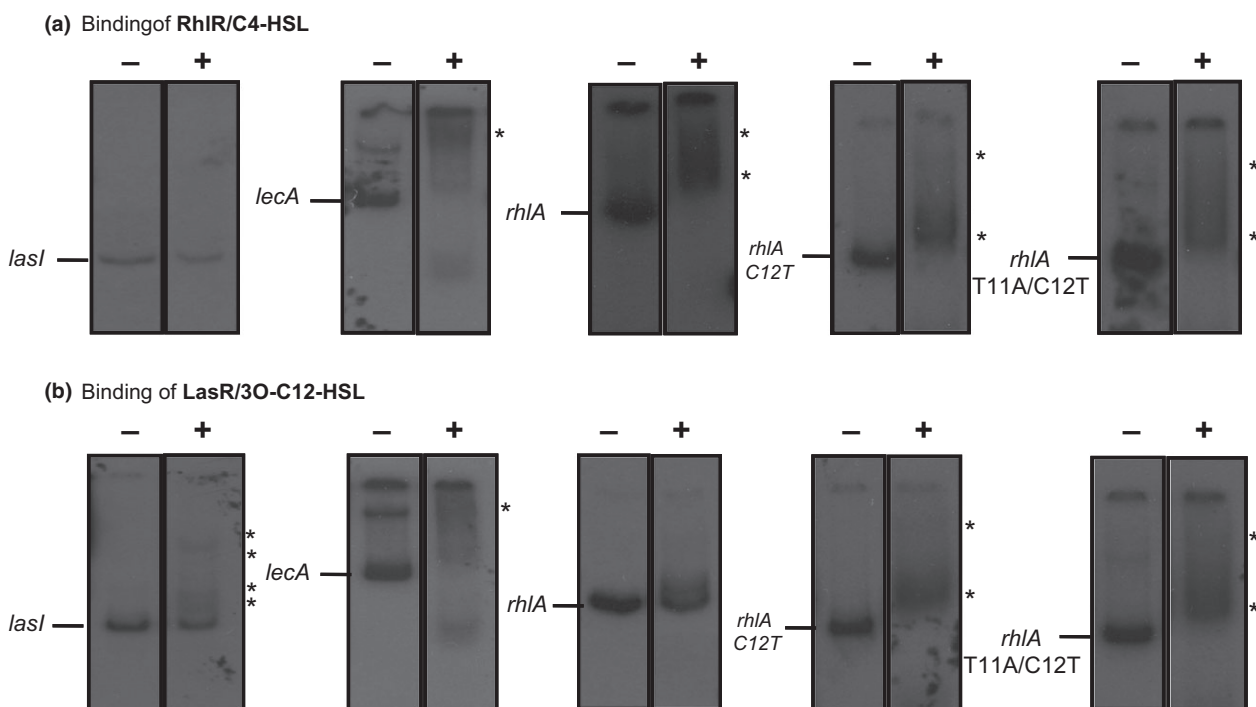


Fig. 1. RhIR/C4-HSL and LasR/3O-C12-HSL DNA-binding determined by electrophoretic mobility shift assays (EMSA). Collage of the lanes of EMSA experiments (Fig. S1) showing the control without protein added (–), and the result of the interaction detected with the higher protein concentration used (+) of either (a) RhIR/C4-HSL or (b) LasR/3O-C12-HSL with PCR products with different las-box sequences. These PCR products correspond to *lasI*-las-box, *lecA*-las-box, *rhlA*-las-box, *rhlA*-las-box with C12T mutation and *rhlA*-las-box containing T11A/C12T double mutant. Gels using nonspecific DNA (from *Geobacter*) used as negative control are shown in Fig. S1.

Table 3. RhIR- and LasR-dependent expression in *Escherichia coli* DH5 α of derivatives of an *rhIA-lacZ* fusion encoded in plasmid pMPCG with different sequences in the *las*-box

	RhIR		LasR	
	-C ₄ -HSL	+C ₄ -HSL	-3OC ₁₂ -HSL	+3OC ₁₂ -HSL
pMPrhIA	2 ± 1*	144 ± 19	ND [†]	5
pMPrhIA-A8T	2 ± 1	21.7 ± 3.8	ND	ND
pMPrhIA-T11A	1 ± 1	65 ± 7	1 ± 0.20	1.45 ± 0.25
pMPrhIA-C12T	2 ± 1	166 ± 24	> 1	4 ± 1
pMPrhIA-A8T/T11A	1 ± 1	5 ± 2	1.18 ± 0.19	2.9 ± 1.13
pMPrhIA-A8T/C12T	2 ± 1	34 ± 6.7	1 ± 0.5	2.35 ± 1.03
pMPrhIA-T11A/C12T	2 ± 1	168 ± 20.6	ND	ND

* β -galactosidase activity expressed in Miller units, \pm standard deviations.

[†]Not determined.

and LasR was reflected by a change in the pattern of activation of *rhIA* gene transcription, we introduced the three single and the three double mutations in the *rhIA-las*-box of a transcriptional *rhIA-lacZ* fusion. The different constructs were cloned in plasmid pMP220 (Table S1), introduced in *E. coli*, and β -galactosidase activity was determined in the presence of plasmids expressing either RhIR (pGMYC, Medina *et al.*, 2003b) or LasR (pMT1, Medina *et al.*, 2003a).

We found that the plasmid containing the A8T mutation in the *rhIA-las*-box, which caused a reduction in RhIR ADDBA, presented a low RhIR/C₄-HSL-dependent activation of transcription (Fig. 2a, Table 3). The same effect is observed with the A8T/T11A and A8T/C12T double mutants (Fig. 2a, Table 3).

However, the plasmid containing the T11A *rhIA-las*-box mutation has a severely reduced RhIR/C₄-HSL-dependent expression (Fig. 2a, Table 3), even though this *las*-box sequence retains a good RhIR ADDBA, both in the presence and the absence of C₄-HSL (Figs 1 and 2a; Table 2). This result suggests that activation of transcription by RhIR/C₄-HSL does not simply result from binding of this protein to a *las*-box located at the right distance from the promoter. In this way, even though RhIR/C₄-HSL is bound to DNA in the case of the *rhIA-las*-box T11A mutant, it is unable to fully activate transcription (Fig. 2a, Table 3). A plausible explanation for this result is that the conformation of RhIR/C₄-HSL is affected by its interaction with specific DNA sequences. This explanation would imply that the

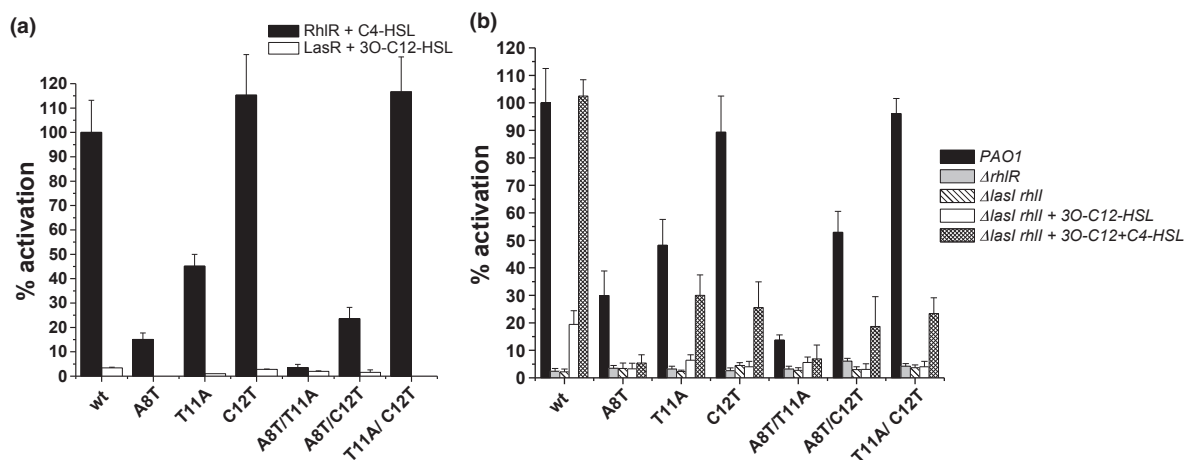


Fig. 2. Expression of *rhIA-lacZ* fusions containing either the wild-type *rhIA-las*-box or its mutant derivatives. (a) shows the expression in *E. coli* DH5 α ; black bars represent the percentage of the RhIR/C₄-HSL-dependent expression of *rhIA-lacZ* fusions containing the wild-type *rhIA-las*-box or its mutant derivatives, while the white bars represent the corresponding LasR/3O-C₁₂-HSL-dependent expression of the same plasmids. The percentage of β -galactosidase activity shown was determined considering plasmid pMPrhIA that contains the wild-type (wt) *rhIA-las*-box as 100% (Table 3). (b) shows the expression in *P. aeruginosa* PAO1 and its $\Delta rhIR$ and *rhII*, *lasI* derived mutants; in some experiments, the *rhII*, *lasI* double mutant, was supplemented with either 3O-C₁₂-HSL or with this autoinducer and C₄-HSL, as stated. The percentage of β -galactosidase activity shown was determined considering plasmid pLPrhIA that contains the wild-type (wt) *rhIA-las*-box as 100% (Table 4).

Table 4. Expression of *rhIA*–*lacZ* fusions from plasmids containing different *las*-boxes in the wild-type *P. aeruginosa* PAO1 strain and its mutant derivatives

	PAO1	$\Delta rhIR$	<i>rhII</i> <i>lasI</i>	<i>rhII</i> <i>lasI</i> + C12*	<i>rhII</i> <i>lasI</i> + C12 +C4*
pLPrhIA	39999 ± 5003	972.8 ± 79	873.4 ± 48	7774 ± 770	41005 ± 2146
pLPrhIA-A8T	11961 ± 3579	1403 ± 176.4	1363 ± 292	1308 ± 99	2159 ± 447
pLPrhIA-T11A	19267 ± 3765	1290 ± 336	923.2 ± 113	2574.2 ± 639.8	11995 ± 886.2
pLPrhIA-C12T	35713 ± 5275	1034 ± 325	1788.9 ± 607.8	1590.4 ± 346	10233 ± 954
pLPrhIA-A8T/T11A	5486 ± 770	1270 ± 103	1061 ± 67	2224 ± 621	2753 ± 799
pLPrhIA-A8T/C12T	21150 ± 3049	2,452 ± 390	1211 ± 244	1222 ± 331	7497 ± 810
pLPrhIA-T11A/C12T	38434 ± 2192	1673 ± 254	1475 ± 307	1590.4 ± 345	9369 ± 535
pLECA-70	1363.37	85.62	70.3	71.55 ± 11	324.67 ± 41
pLP170	242.7 ± 49	260.9 ± 35	225.9 ± 39	256.39 ± 36	260.59 ± 27

*The *rhII*, *lasI* double mutant, was supplemented with 3O-C12-HSL or with both 3O-C12-HSL and C4-HSL. ND means not done.

interaction of a bacterial transcriptional activator with a specific DNA sequence causes a change of conformation that modifies its interaction with RNA-polymerase (RNA-P) and in this case caused a drastic reduction of its activation ability. This possibility remains to be further studied.

On the other hand, the plasmid containing the *rhIA*-*las*-box C12T mutation, which is only bound by RhIR in the presence of C4-HSL (Table 2), as well as the plasmid containing the *rhIA*-*las*-box T11A/C12T double mutation, showed a similar level of expression as the gene containing the wild-type *rhIA*-*las*-box (Fig. 2a; Table 3). These results can also be explained, considering that the conformation of RhIR/C4-HSL bound to *rhIA*-*las*-box mutant T11A, which shows a reduced level of transcriptional activation, is restored to a conformation that can activate transcription in the presence of an additional *rhIA*-*las*-box mutation (C12T), which by itself has the only apparent effect of losing the ability to be bound by RhIR in the absence of C4-HSL (Table 2).

We were particularly interested in determining whether plasmids containing *rhIA*-*las*-box T11A or C12T single mutations, which present the novel characteristic of being recognized by LasR/3O-C12-HSL (Fig. 1, Table 2), showed a new expression pattern that was dependent on LasR. However, we found that neither of these two plasmids, containing the T11A or C12T *rhIA*-*las*-box mutations, was expressed by this LasR/3O-C12-HSL (Fig. 2, Table 3).

Expression of transcriptional *rhIA*–*lacZ* fusions with point mutations in the *rhIA*-*las*-box in *P. aeruginosa* PAO1 and its derived mutants

To determine whether the pattern of transcription observed in *E. coli* was maintained in the *P. aeruginosa* PAO1 genetic background, we constructed transcriptional *lacZ* fusions in plasmid pLP170 (Preston *et al.*, 1997) that contained either the original sequence of the *rhIA*

promoter, including its *las*-box (pLPrhIA, Table 4), or the *las*-box mutant derivatives (Table 4).

To determine the transcription dependence on RhIR and LasR, we compared the levels of *lacZ* expression from the different plasmids with *lacZ* fusions in the *P. aeruginosa* PAO1 type strain, with the levels obtained in an *rhIR* mutant, and a *rhII*, *lasI* double mutant (without addition, with 3O-C12-HSL, or with both C4-HSL and 3O-C12-HSL).

Our results show that in *P. aeruginosa*, *rhIA*–*lacZ* fusions from plasmid pLPrhIA, the plasmids containing mutations in the *rhIA*-*las*-box, and the *lecA*–*lacZ* fusion in plasmid pLECA-70 are activated by RhIR/C4-HSL (Fig. 2b, Table 4). LasR/3O-C12-HSL also contributes to a small extent in the expression of the *rhIA* gene when containing the wild-type *las*-box sequence, but does not activate the expression of any of the mutants studied (Fig. 2b, Table 4), even if LasR/3O-C12-HSL is able to bind to some of these DNA sequences (Fig. 1; Table 2).

We found in accordance with previous results that the A8T *rhIA*-*las*-box mutation causes the greatest reduction in gene expression in the PAO1 background (Fig. 2b; Table 4) and that the T11A mutation of this *las*-box also results in a lower level of gene transcription (Fig. 2b; Table 4), while the C12T *rhIA*-*las*-box mutation has not a significant effect on *rhIA* expression. However, we found that plasmid pLPrhIA-A8T/C12T presents a much higher level of expression than plasmid pLPrhIA-A8T (Fig. 2b; Table 4). This result shows that the change in position 12 (C to T) compensates the deleterious effect of A8T or the T11A mutations in the *rhIA*-*las*-box and reinforces the conclusion that the interaction of RhIR with DNA sequences is a complex phenomenon that is not only important for the binding of this protein *per se*, but also for the ability of this transcriptional factor to activate transcription, maybe through the modulation of its interaction with RNA-P.

We found that the expression of the *rhIA*–*lacZ* fusions with mutations in the *rhIA*-*las*-box and pLECA-70 did

not attain the same levels of expression as the wild-type PAO1 strain in the *rhlI*, *lasI* double mutant supplemented with both C4-HSL and 3O-C12-HSL, while the expression from plasmid pLPrhIA was fully restored (Fig. 2b, Table 4). We do not have any explanation for the lack of complementation in this condition.

Conclusions

The results obtained in this work show that sequences that are not conserved among different binding sequences recognized by certain proteins (i.e., divergent positions in the *rhlA*- and *lecA-las*-boxes that are both bound by RhlR) can play a role in the selective binding of a protein.

Our work also provides evidence suggesting that the conformation of a transcriptional regulator might be affected by the specific DNA sequence to which it is bound. An example of this is that RhlR/C4-HSL is able to bind with a good apparent affinity to the T11A mutation in the *rhlA-las*-box (Fig. 1, Table 2), but activates transcription very poorly when bound to this sequence as compared with the expression of a gene containing the wild-type *rhlA-las*-box sequence, both in *E. coli* (Fig. 2a, Table 3) and in *P. aeruginosa* (Fig. 2b, Table 4). This situation also applies to LasR/3-O-C12-HSL, when interacting with *rhlA-las*-box containing the T11A and C12T mutations, and with the *lecA-las*-box (Fig. 2, Tables 2–4).

Thus, our results show that the specificity of DNA binding and the activation of gene transcription by RhlR and LasR QS regulators are very complex phenomena and that future research is needed to unravel the molecular mechanisms involved.

Acknowledgements

This research was funded in part by DGPA-UNAM PAP-IIT (grant IN203613). This work represents AAGV PhD thesis done in Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM. Oligonucleotides and automated sequencing were performed by the Unit for DNA Sequence and Synthesis of the Instituto de Biotecnología, UNAM.

References

- Aguirre-Ramírez M, Medina G, González-Valdez A, Grosso-Becerra V & Soberón-Chávez G (2012) *Pseudomonas aeruginosa* *rmlBDAC* operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum-sensing transcriptional regulator RhlR and the alternative sigma S factor. *Microbiology* **158**: 908–916.
- Baba T, Ara T, Hasegawa M, Takai Y, Okumura Y, Baba M, Datsenko KA, Tomita M, Wanner BL & Mori H (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**: 1–11.
- Casadaban MJ (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**: 541–555.
- Croda-García G, Grosso-Becerra V, González A, Servín-González L & Soberón-Chávez G (2011) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*: role of the Crp-ortholog Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhlR. *Microbiology* **157**: 2545–2555.
- 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.
- Driscoll JA, Brody SL & Kollef MH (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* **67**: 351–368.
- Elliott T (1992) A method for constructing single-copy *lac* fusions in *Salmonella typhimurium* and its application to the *hemA-prfA* operon. *J Bacteriol* **174**: 245–253.
- Lindsay A & Ahmer BMM (2005) Effect of *sdhA* biosensors of *N*-acylhomoserine lactones. *J Bacteriol* **187**: 5054–5058.
- Medina G, Juárez K, Díaz R & Soberón-Chávez G (2003a) Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* **149**: 3073–3081.
- Medina G, Juárez K, Valderrama B & Soberón-Chávez G (2003b) Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J Bacteriol* **185**: 5976–5983.
- Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics*, pp. 431–435. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Preston MJ, Seed PC, Toder DS, Iglewski BH, Ohman DE, Gustin JK, Goldberg JB & Pier GB (1997) Contribution of proteases and LasR to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infections. *Infect Immun* **65**: 3086–3090.
- Sambrook J & Russell DW (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Shuster M & Greenberg EP (2007) Early activation of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* reveals the architecture of a complex regulon. *BMC-Genomics* **8**: 287. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/287>.
- Simons RW, Houman F & Kleckner N (1987) Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85–96.
- Soberón-Chávez G, Aguirre-Ramírez M & Ordóñez LG (2005) Is *Pseudomonas aeruginosa* only sensing quorum? *Crit Rev Microbiol* **31**: 171–182.
- Spaink H, Okker R, Wijffelman C, Pees E & Lugtenberg B (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium*

- leguminosarum* Sym plasmid pRL1Jl. *Plant Mol Biol* **9**: 27–39.
- Wenner N, Maes A, Cotado-Sampayo M & Lapouge K (2014) NrsZ: a novel, processed, nitrogen-dependent, small non-coding RNA that regulates *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Environ Microbiol* **16**: 1053–1068.
- Whiteley M & Greenberg EP (2001) Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J Bacteriol* **183**: 5529–5534.
- Whiteley M, Lee KM & Greenberg EP (1999) Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *P Natl Acad Sci USA* **96**: 13904–13909.
- Williams P & Cámara M (2009) Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* **12**: 182–191.
- Winzer K, Falconer C, Garber NC, Diggle SP, Cámara M & Williams P (2000) The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* **182**: 6401–6411.
- Zhang Y & Miller RM (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* **58**: 3276–3282.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

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

Table S2. Apparent DNA-binding ability (ADAB) of QS-transcriptional regulators RhlR and LasR to different las-box sequences, in the absence and presence of their cognate autoinducer in the SdiA mutant background*.

Table S3. Oligonucleotides used in this work for Sequencing, Natural promoter and EMSA assay, Artificial promoter and Mutagenesis.

Fig. S1. Electrophoretic mobility shift assay to determine interaction of RhlR/C4-HSL (a) or LasR/3O-C12-HSL (b) with PCR product containing different las-box sequences.

Copyright of FEMS Microbiology Letters is the property of Wiley-Blackwell and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.