



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

UN/M
POSGRADO

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA
PROTEÍNA *LasR* A LA CAJA *las* DEL GENE *lasB*
DE *Pseudomonas aeruginosa*

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

ARLETH AGUILAR
DE LA PAZ

Tutor: DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ



MÉXICO, D. F. DICIEMBRE DE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Y CONOCEREIS LA VERDAD Y LA VERDAD
OS HARÁ LIBRES

JUAN 8:32

DEDICATORIAS:

A mi esposo Eduardo.

Por creer en mí cuando ni yo misma lo hacía, por ser mi apoyo en los momentos oscuros, por su paciencia pero sobre todo, por amarme.

A mis padres Mario y Olga.

Por ser sustento en todos los ámbitos de mi vida, por sus grandes y pequeñas enseñanzas, por mostrarme el valor de la fuerza, de la valentía, de la disciplina, de la entereza y de la templanza; por su infinito amor e inagotable apoyo.

A mi hermano Mario, a mi cuñada Marcela, a mis sobrinos Saygid, Aline y los dos que espero con enorme alegría.

Por hacerme tía y darme tanta alegría con su gran familia.

Llegas, silenciosa, secreta,
y despiertas los furores, los goces,
y esta angustia
que enciende lo que toca
y engendra en cada cosa
una avidez sombría.

El mundo cede y se desploma
como metal al fuego.
Entre mis ruinas me levanto,
sólo, desnudo, despojado,
sobre la roca inmensa del silencio,
como un solitario combatiente

Verdad abrasadora,
¿a qué me empujas?
No quiero tu verdad,
tu insensata pregunta.
¿A qué esta lucha estéril?
No es el hombre criatura capaz de contenerte,
avidez que sólo en la sed se sacía,
llama que todos los labios consume,
espíritu que no vive en ninguna forma
mas hace arder todas las formas contra invisibles huestes.

Subes desde lo más hondo de mí,
desde el centro innombrable de mí ser,
ejército, marea.
Creces, tu sed me ahoga,
expulsando, tiránica,
aquello que no cede
a tu espada frenética.

Ya sólo tú me habitas,

tú, sin nombre, furiosa substancia,
avidez subterránea, delirante.

Golpean mi pecho tus fantasmas,
despiertas a mi tacto,
híelas mi frente,
abres mis ojos.

Percibo el mundo y te toco,
substancia intocable,
unidad de mi alma y de mi cuerpo,
y contemplo el combate que combato
y mis bodas de tierra.

Nublan mis ojos imágenes opuestas,
y a las mismas imágenes
otras, más profundas, las niegan,
ardiente balbuceo,
aguas que anega un agua más oculta y densa.
En su húmeda tiniebla vida y muerte,
quietud y movimiento, son lo mismo.

Insiste, vencedora,
porque tan sólo existo porque existes,
y mi boca y mi lengua se formaron
para decir tan sólo tu existencia
y tus secretas sílabas, palabra
impalpable y despótica,
substancia de mi alma.

Eres tan sólo un sueño,
pero en tí sueña el mundo
y su mudez habla con tus palabras.
Rozo al tocar tu pecho

la eléctrica frontera de la vida,
la tiniebla de sangre
donde pacta la boca cruel y enamorada,
ávida aún de destruir lo que ama
y revivir lo que destruye,
con el mundo, impasible
y siempre idéntico a sí mismo,
porque no se detiene en ninguna forma
ni se demora sobre lo que engendra.

Llévame, solitaria,
llévame entre los sueños,
llévame, madre mía,
despiértame del todo,
hazme soñar tu sueño,
unta mis ojos con aceite,
para que al conocerte me conozca.

OCTAVIO PAZ

AGRADECIMIENTOS:

A Dios.

A la Dra. Gloria Soberón Chávez.

Por acogermé en su grupo como alumna, en medio de mi obscuridad en la Biología Molecular y en el mundo de la *Pseudomona aeruginosa*.

A los miembros de mi comité tutorial y de mi jurado de examen: Dra. Rosa Laura Camarena, Dra. Elda Guadalupe Espín, Dr. Dimitrios Georgellis, Dr. Luis Servín y Dr. José Luis Puente.

Por sus aportaciones y propuestas a lo largo de la maestría, en cada una de mis evaluaciones y en la revisión de mi tesis.

A mis compañeros tanto del laboratorio como del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

No los nombro uno a uno pues la lista sería muy larga ya que todos contribuyeron de una manera importante y especial: mil gracias por su apoyo y ayuda en el trabajo diario pues me permitieron ver la luz cuando pensaba que "la técnica nunca me saldría".

A mi esposo y familia.

Quiénes saben que en momentos como estos, las palabras sobran.

A Román y Maribel, mis suegros.

Por su gran apoyo en los tiempos complicados.

A mis amigos: Gerry Croda, Paty Basán, Eva Juárez y Ramón Salto, Hortensia Flores, Gaby Góngora (q.e.p.d.), Sombra Rivas y Alberto (pues lo simple sigue siendo bello).

Por brindarme su amistad y por permitirme construir un mundo con ellos.

A todos los espejos, sillas y piedras que me he encontrado en el camino.

Porque su presencia me ha permitido ser más fuerte día a día.

A Leticia García.

Por su carácter tan agradable y su gran apoyo en el ámbito administrativo en el posgrado.

Al Café "La Selva" Valle y su personal.

Por el espacio y ameno trato que me permitió desarrollar este escrito.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Gloria Soberón Chávez en el laboratorio de Genética Molecular de la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa*, en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El proyecto fue apoyado por CONACYT (50201) Genética molecular de la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa*: un modelo para el estudio de la respuesta sensora de quórum, 2006-2009 y DGPA-UNAM PAPIIT (IN200707) Genética molecular de la respuesta sensora de quórum de *Pseudomonas aeruginosa*, 2007-2009. Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT y por DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Al Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dra. Gloria Soberón Chávez

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Dimitrios Georgellis

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Al Dr. Luis Servín González por su asesoría.

Al Dr. Humberto García Arellano y la M. en C. Marisela Aguirre Ramírez por su asesoría técnica.

Al Jurado de Examen que estuvo constituido por:

Dr. Luis Servín González

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Presidente

Dr. José Luis Puente García

Instituto de Biotecnología, UNAM

Vocal

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo

Instituto de Biotecnología, UNAM

Secretario

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Suplente

Dr. Dimitrios Georgellis

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Suplente

ÍNDICE	I
INTRODUCCIÓN	01
1. BIOLOGÍA DE <i>Pseudomonas</i>	01
1.1. Descripción de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO	02
1.2. Diversidad genómica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	02
1.2.1. Diversidad del genoma central	03
2. FACTORES DE VIRULENCIA	
2.1. Clasificación de los Factores de Virulencia	04
2.1.1. Factores de virulencia asociados a la célula	04
2.1.1.1. Adherencia a células epiteliales	05
2.1.1.2. Adherencia a Mucina	06
2.1.1.3. Adherencia a superficies abióticas	06
2.1.2. Factores de virulencia Extracelulares	06
2.1.2.1. Factores de virulencia secretados por vías de secreción Tipo I	07
2.1.2.2. Proteasa alcalina	07
2.1.2.3. Factores de virulencia secretados por vías de secreción Tipo II	07
2.1.2.3.1. Exotoxina A	08
2.1.2.3.2. Elastasas LasA y LasB	08
2.1.2.3.3. Fosfolipasa C	10
2.1.2.3.4. Proteasa IV	11
2.1.2.3.5. Lipasas	11
2.1.2.4. Factores de virulencia secretados por vías de secreción Tipo III: Exoenzimas S,T,Y. y Exotoxina U	11
2.1.3. Otros Factores de virulencia	12
2.1.3.1. Ramnolípidos	12

2.1.3.2. Piocianina	13
2.1.3.3. Sideróforos	13
2.1.3.4. Ácido cianhídrico	13
3. QUORUM SENSING	14
3.1. Quorum Sensing en <i>Vibrio fischeri</i>	14
3.2. Quorum Sensing en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
3.2.1. Sistemas las y rhl y sus autoinductores	16
3.2.2. El tercer homólogo de LuxR en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
3.2.3. PQS, una tercera molécula señal	17
3.2.4. Regulación del circuito Quorum Sensing	18
ANTECEDENTES	21
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. CEPAS BACTERIANAS Y SU CONSERVACIÓN	
1.1. Estirpes bacterianas empleadas	27
1.2. Conservación de las estirpes bacterianas	28
2. PLÁSMIDOS	28
3. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	31
3.1. Medios de cultivo	31
3.2. Aminoácidos	33
3.3. Antibióticos	33
3.4. Condiciones de cultivo	33

4. TRANSFERENCIA DE PLÁSMIDOS	33
4.1. Preparación de células competentes	33
4.2. Transferencia por choque térmico	35
5. AISLAMIENTO DE DNA	36
5.1. Aislamiento de DNA plasmídico	36
5.2. Extracción de DNA cromosómico	38
6. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN DE DNA	38
6.1. Determinación de la concentración de DNA	38
6.2. Digestión de DNA con enzimas de restricción	38
6.3. Electroforesis de DNA	38
6.4. Recuperación de fragmentos de DNA	39
6.5. Secuenciación de DNA	39
6.6. Reacción de amplificación en cadena (PCR)	39
7. TRANSDUCCIÓN	40
8. EXTRACCIÓN DE AUTOINDUCTORES	42
9. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE N-BUTIRIL-HOMOSERINA LACTONA (C4-HSL)	43
10. CUANTIFICACIÓN DE RAMNOLÍPIDOS	44
11. CUANTIFICACIÓN DE PIOCIANINA	44
12. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ELASTOLÍTICA	45
13. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA	45

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
1. INTERACCIÓN DE AMBOS AUTOINDUCTORES (C4-HSL Y 3O-C12-HSL) EN LA FUSIÓN pMP220 ϕ (OP1 <i>LASB</i> :: <i>LACZ</i>) EN <i>E. coli</i>	48
1.1. Curvas de crecimiento	48
1.2. Expresión de la actividad de la β -Galactosidasa en la fusión pMP220 ϕ (OP1 <i>lasB</i> :: <i>lacZ</i>) en <i>E. coli</i>	49
2. INTERACCIÓN DE AMBOS AUTOINDUCTORES (C4-HSL Y 3O-C12-HSL) EN pECP64 EN <i>E. coli</i>	50
2.1. Curvas de crecimiento	51
2.2. Expresión de la actividad de la β -Galactosidasa en <i>E. coli</i>	52
3. COMPETENCIA ENTRE C4-HSL Y 3O-C12-HSL	54
3.1. Presencia de diferentes concentraciones de ambos autoinductores	54
3.2. Adición de C4-HSL posterior a la adición de 3O-C12-HSL	55
3.3. Adición de 3O-C12-HSL posterior a la de C4-HSL	57
4. OBTENCIÓN DE MUTANTES DE PAO1 POR TRANSDUCCIÓN	59
4.1. Obtención de PAO1 Δ <i>rhII</i> , PAO1 Δ <i>rhIR</i> y PAO1 Δ <i>rhIR</i> Δ <i>rhII</i>	59
4.2. Determinación de N-Butiril-Homoserina Lactona (C4-HSL)	60
4.3. Cuantificación de la concentración de Ramnolípidos, Piocianina y Actividad Elastolítica	63
CONCLUSIONES	70
PERSPECTIVAS	71
LITERATURA CITADA	72

INTRODUCCIÓN

1. Biología de *Pseudomonas*.

El término *Pseudomonas* fue creado por Migula (1894) como un género para definir a las Pseudomonadales y las describe como “Células con estructuras polares móviles. La formación de esporas se da en algunas especies, pero es un fenómeno raro”. Dado que esta definición fue aceptada por largo tiempo, muchas de las especies que estaban incluidas en otros géneros, fueron clasificadas en éste. El sistema de clasificación hasta la década de los 60 se basaba fundamentalmente en la descripción morfológica y fisiológica hasta ciertos límites (Palleroni, 2003). De acuerdo a la definición que aparece en el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática, las *Pseudomonas* son “células en forma de bastón, curvadas o derechas pero no helicoidales, de entre 0.1 a 0.5 μm de diámetro y de entre 1.5 a 5.0 μm de longitud”. Posteriormente y gracias al desarrollo de técnicas tales como la hibridación DNA/DNA y la hibridación RNAr/DNA (Palleroni, 1973) se logró una mayor claridad en la división de las especies de *Pseudomonas*. Palleroni siguiendo esta última clasificación propuso 5 grupos taxonómicos: RNA-I al RNA-V. Finalmente con la utilización de la secuenciación del RNAr-16S se ha descubierto la gran diversidad en cada uno de estos grupos. Es el grupo RNA-I dentro de la subclase γ -Proteobacterias (de Vos *et al.*, 1989; Woese *et al.*, 1985) el que engloba a las verdaderas *Pseudomonas* (Krieg & Garrity, 2001).

La mayoría de las cepas no acumulan poli-beta-hidroxibutirato (PHB) como material de reserva, sin embargo acumulan poli-beta-hidroxialcanoatos con grandes cadenas de hidroxibutirato (PHAs) cuando se cultivan en alcanos o gluconato (Palleroni, 2005). Algunas especies pueden crecer con sacarosa y utilizan ambos componentes monosacáridos, sin embargo algunas cepas como *P. pseudoalcaligenes*, sólo utilizan la glucosa y la fructuosa la acumulan en forma de polisacáridos. Son aeróbicas, pero cuando se encuentran bajo condiciones de anaerobiosis utilizan el nitrato como aceptor de electrones alternativo. Las *Pseudomonas* son bacterias móviles presentando uno o más flagelos polares aunque se han descrito algunos flagelos laterales más cortos.

1.1. Descripción de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Etimológicamente *Pseudomonas* significa “falsa unidad” (del griego “pseudo”, falso; y “monas”, unidad) y *aeruginosa* que proviene del cardenillo o del óxido de cobre, el cual hace referencia a la coloración verdosa debido a los pigmentos que secreta. *Pseudomonas* es una bacteria gram-negativa perteneciente al Filo de las *Proteobacterias* (Stackebrandt *et al.*, 1986) y a la Clase γ *Proteobacterias*, Orden *Pseudomonadales*, Familia *Pseudomonadaceae*, Género *Pseudomonas* y Especie *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872 y Migula, 1894).

P. aeruginosa es una bacteria ubicua y con una gran versatilidad metabólica ya que se ha aislado tanto en ambientes terrestres como acuáticos (Ramos, 2004). Es un importante patógeno oportunista para humanos, animales y plantas. Produce infecciones severas en hospederos inmunocomprometidos, siendo la principal causa de mortalidad sobre todo en pacientes con fibrosis quística.

1.2. Diversidad genómica de *Pseudomonas aeruginosa*.

El genoma de *P. aeruginosa* comprende un cromosoma circular con un contenido de G+C de entre 65 a 67% y un número variable de plásmidos. El genoma consiste de un cromosoma con un core central e información accesorio, por lo que el tamaño genómico varía entre 5.2 a 7 Mpb (Schmidt *et al.*, 1996), Figura I1. La principal referencia es la cepa PAO1 la cual posee una densidad codificante de 89.35% y su secuencia codificante predice 5,570 proteínas (Stover *et al.*, 2000), entre éstas se encuentra una gran diversidad de transportadores, reguladores transcripcionales, sistemas reguladores de dos componentes. Esto refleja la gran versatilidad metabólica con la consecuente capacidad de colonizar un amplio rango de nichos: desde los terrestres, acuáticos, rizósfera, mucosa animal, entre otros.

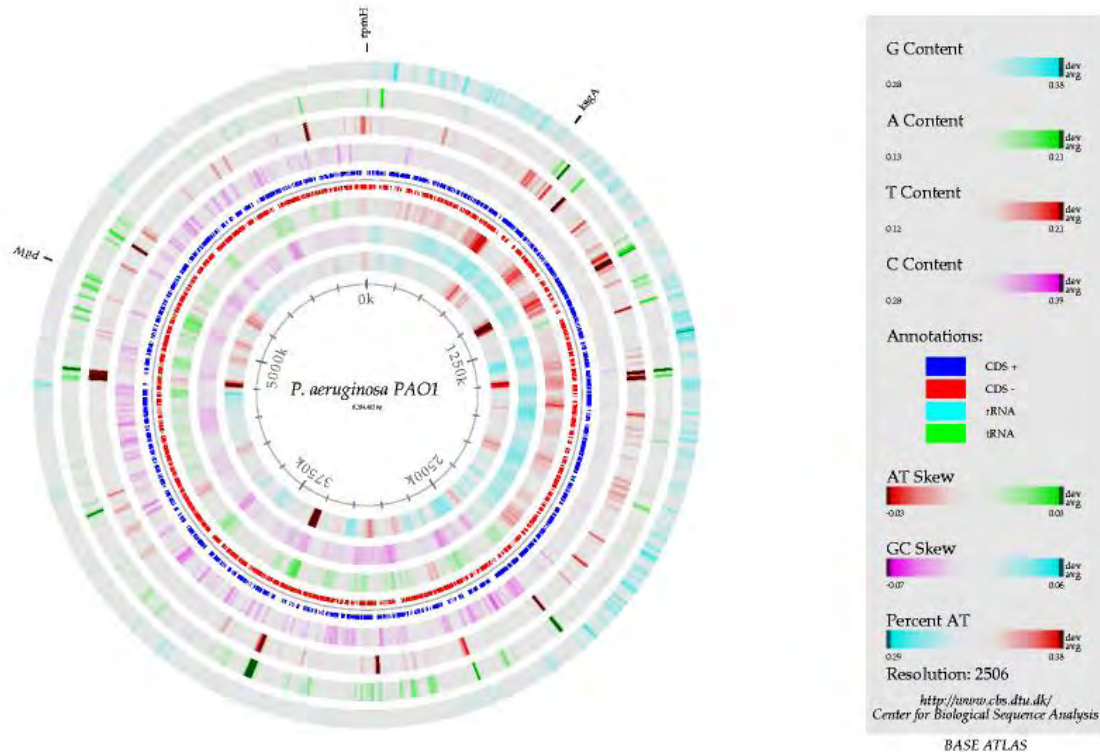


Figura 11. Mapa genómico de *Pseudomonas aeruginosa*, el tamaño de genoma varía entre 5.2 y 7.0 Mpb debido al genoma accesorio de cada cepa, es rico en G-C y su densidad codificante es de casi el 90%.

1.2.1. Diversidad del genoma central.

Existen tres puntos de diversidad en la secuencia en el genoma central de *P. aeruginosa* entre diferentes cepas secuenciadas: el locus de pioverdina, el locus de biosíntesis del antígeno O, pilA y el regulón flagelar. Cada locus se encuentra presente en cada una de las cepas secuenciadas, sin embargo los genes en cada una de ellas presenta alta divergencia.

En el caso de la pioverdina que es el sideróforo principal de *P. aeruginosa*, cada cepa puede producir tres sideróforos diferentes, cada uno de ellos con una cadena peptídica diferente que es sintetizada no ribosomalmente (Ravel and Cornelis, 2003; Visca *et al.*, 2007)

2. Factores de Virulencia.

P. aeruginosa es un patógeno oportunista causante de una amplia variedad de infecciones en el ser humano entre ellas se encuentran: infecciones del tracto urinario,

queratitis ulcerativa aguda, otitis media maligna, peritonitis, neumonía aguda en pacientes con intubación endotraqueal, infecciones en pacientes con quemaduras e infecciones destructivas crónicas en pacientes con fibrosis quística. Las personas más susceptibles de ser infectadas por esta bacteria son aquellos que sufren de enfermedades severas (pacientes quemados o mecánicamente ventilados) o cuyo sistema inmune se encuentra disminuido (por neutropenia, VIH) además de aquellos que sufren fibrosis quística. Las circunstancias de salud previas más la o las infecciones causadas por *P. aeruginosa* elevan dramáticamente los índices de mortalidad. La gran cantidad de enfermedades causadas por *P. aeruginosa* es debida a una gran variedad de factores de virulencia que produce y que pueden actuar individualmente o en conjunto.

2.1. Clasificación de los Factores de virulencia.

Los factores de virulencia producidos por *P. aeruginosa* pueden ser clasificados de varias maneras, ya sea por su mecanismo de acción, por su papel en el modelo de infección, o por estar asociados a la célula o ser excretados al medio extracelular. Se decidió seguir la última clasificación por ser más práctica. De esta manera los factores de virulencia se clasifican en dos grupos de acuerdo a la relación física que mantienen con la bacteria: aquellos que se encuentran asociados a la célula y los que son excretados al espacio extracelular. Estos últimos se clasifican en tres subgrupos de acuerdo a su vía de secreción: los secretados por la vía de secreción tipo I, tipo II ó tipo III.

2.1.1. Factores de virulencia asociados a la célula.

El primer paso en la infección de *P. aeruginosa* es la colonización de superficies epiteliales utilizando adhesinas específicas para iniciar el contacto con las superficies biológicas del hospedero, principalmente células epiteliales de vías respiratorias estableciendo la colonización en el tracto respiratorio. Para adherirse al epitelio *P. aeruginosa* utiliza factores de adherencia específicos para iniciar el contacto con superficies biológicas del hospedero.

2.1.1.1. Adherencia a células epiteliales.

En individuos sanos *P. aeruginosa* coloniza la orofaringe del 6% de éstos, pero en individuos hospitalizados el porcentaje aumenta a más del 50% (Pollack, 2000). La adhesión de la bacteria a la superficie de células epiteliales es un proceso complejo (de Bentzmann *et al.*, 1996), sobre todo en el tracto respiratorio en el que se encuentra el aparato mucociliar que se encarga de la defensa contra bacterias patogénicas. Otro factor de importancia es la presencia de fibronectina la cual también es responsable de este tipo de defensa. Las condiciones que disparan la expresión de los factores de adherencia son heridas en las superficies epiteliales producidas por intubación endotraqueal (Ramphal *et al.*, 1980) y/o cambios en células epiteliales por influenza, por ejemplo. El daño en células epiteliales favorece la unión de esta bacteria a superficies biológicas, proceso en que están involucrados más componentes de la matriz extracelular, pero que se exponen cuando éstas se dañan (Ramphal *et al.*, 1980).

Al parecer, *P. aeruginosa* no interactúa con fibronectina plasmática (que circula a través del torrente sanguíneo y que es soluble), ni con fibronectina celular insoluble (fibrillas de fibronectina que forman parte de la matriz celular), pero sí interactúa con fibronectina celular soluble que es liberada por células epiteliales dañadas (Ramphal *et al.*, 1980). Este proceso genera un “puente” entre la bacteria y los receptores celulares de las células epiteliales, OprF es una de las principales proteínas de la membrana celular externa que contribuye mayormente a la adherencia de la bacteria (Azghani *et al.*, 2002).

Otro tipo de metabolitos secundarios considerados como factores de virulencia y que funcionan como adhesinas son las lectinas (PA-IL y PA-IIL) aunque también parecen funcionar como citotoxinas de las células epiteliales del aparato respiratorio. La expresión de ambos tipos de lectinas está regulada vía Quorum Sensing como otros de los factores de virulencia aquí mencionados (Winzer *et al.*, 2000).

La adherencia no mucoide de *P. aeruginosa* está mediada por otro tipo de factores como los pili tipo IV, que le dan cerca del 90% de su capacidad de adherencia (de Bentzmann *et al.*, 1996).

2.1.1.2. Adherencia a mucina.

P. aeruginosa también interactúa con la mucina que es el principal componente del moco que forma un gel espeso en el epitelio ciliado de las vías respiratorias. Su función es la de atrapar y limpiar con ayuda del aparato mucociliar las vías respiratorias de cualquier partícula que penetra y se deposita en ellas. La presencia de receptores bacterianos a mucina no es por sí misma un factor de virulencia propiamente dicho; sin embargo, cuando el individuo sufre una afección crónica o enfermedad terminal y su sistema inmunológico se encuentra sumamente comprometido o debilitado, la presencia de bacterias con gran cantidad de receptores a mucina incrementan las posibilidades de colonización bacteriana (Ramphal *et al.*, 1996).

2.1.1.3. Adherencia a superficies abióticas.

La adhesión a superficies abióticas, como por ejemplo, el cloruro de polivinil (PVC), implica como primer paso de la colonización la formación de biopelículas y requiere de la formación de flagelos para ello, por lo que se sugiere que los flagelos están involucrados en la motilidad pero también en el primer contacto con superficies inertes. Un estudio demostró que mutantes incapaces de formar flagelos tampoco pueden colonizar superficies abióticas (O'toole and Kolter, 1998). Asimismo, mutantes afectadas en la producción de pili tipo IV colonizaron este tipo de superficies formando una monocapa pero fueron incapaces de formar las microcolonias características, (Ramphal *et al.*, 1987).

2.1.2. Factores de virulencia extracelulares.

Después del contacto inicial entre *P. aeruginosa* y el hospedero, sigue la colonización de éste. Dado que la colonización implica el establecimiento de la bacteria y su duplicación, la célula produce una serie de factores de virulencia, los cuales son excretados al espacio extracelular y pueden causar daños serios en tejido, invadir el torrente sanguíneo y diseminarse para localizar el nicho con las condiciones idóneas para su establecimiento. De acuerdo a estudios *in vivo*, no todos los factores de virulencia son indispensables en este proceso, sin embargo la aportación que hace cada uno de ellos y la contribución en conjunto

causa mayor daño y los efectos en cada hospedero pueden ser diferentes (Nicas and Iglewsky, 1985).

Como se mencionó anteriormente, los factores de virulencia extracelulares se dividen en tres grupos de acuerdo al tipo de sistema de secreción mediante el cual son transportados al exterior celular. Los sistemas de secreción son de tres tipos: Tipo I, Tipo II ó Tipo III.

2.1.2.1. Factores de virulencia secretados por Sistema de Secreción Tipo I.

La vía de secreción Tipo I (exportadores ABC) consisten de tres proteínas de membrana: AprD, AprE, AprF (Duong *et al.*, 2001). AprD es una proteína que posee un cassette de unión a ATP, AprE es una proteína de unión a membrana y AprF es una proteína de la membrana externa. En este mecanismo de translocación, los productos secretados no pasan por el espacio periplásmico. Estos exoproductos que han sido estudiados son: proteasa alcalina, HasAp y AprX.

2.1.2.1.1. Proteasa Alcalina

Si bien el rol de la proteasa alcalina aún no es muy claro, hay evidencia de que durante el proceso de colonización no deja de ser importante. La proteasa alcalina es una metaloproteasa y su expresión está regulada por la respuesta sensora de quorum (denominado Quorum Sensing) en *P. aeruginosa* (Gambello *et al.*, 1993). Tampoco se sabe con exactitud cuál o cuáles son sus sustratos específicos. Juega un papel importante durante el desarrollo de infecciones de córnea ya que en estudios previos en un modelo animal se reportó que mutantes deficientes en la producción de proteasa alcalina no colonizaban la córnea ni causaban daño a éstas (Howe and Iglewsky, 1984). Sin embargo, estudios posteriores realizados en ratones no demostraron una disminución considerable de la virulencia en mutantes deficientes en la producción de proteasa alcalina.

2.1.2.2. Factores de virulencia secretados por sistema de secreción Tipo II.

La mayoría de los factores de virulencia producidos por *P. aeruginosa* son secretados por esta vía, entre ellos se encuentran: las elastasas LasA y LasB, exotoxina A, lipasas,

fosfolipasa C y proteasa IV, aunque también pueden ser secretados por un sistema de secreción general (GSP) que se realiza en un proceso de dos pasos (Filloux *et al.*, 1998). Los productos que son translocados por esta vía son producidos como precursores con péptido señal en el extremo N-terminal el cual se divide durante el transporte a través de la membrana citoplasmática; este proceso lo realiza la maquinaria Sec. En el periplasma, las proteínas maduran y adoptan su conformación final para posteriormente ser transportadas al exterior a través de la membrana externa por la maquinaria *Xcp* (aparato de secreción compuesto por 12 genes *xcp*), la cual se ha sugerido que es regulada por Quorum Sensing.

2.1.2.2.1. Exotoxina A (ETA).

La exotoxina A (ETA) está codificada por el gen *toxA* y es secretada al medio extracelular por el Sistema de Secreción Tipo II, penetra en el interior de células eucariontes mediante endocitosis gracias a un receptor y la vesícula endocítica se escinde de la membrana citoplasmática de la célula eucarionte. La toxina es traslocada al citoplasma en donde realiza varias funciones una consecuencia de otra: Cataliza la ADP-ribosilación inactivando la elongación del factor 2, inhibe la síntesis proteica y lleva a la muerte celular (Wick *et al.*, 1990) lo que causa daño celular localizado, estimula la invasión bacteriana y se cree que podría tener actividad inmunosupresora.

En muestras de esputo de pacientes con fibrosis quística se ha encontrado una alta correlación positiva entre los niveles de exotoxina A y la de anticuerpos anti-ETA. Sin embargo entre más altos son los niveles de anti-ETA, se incrementa la probabilidad de muerte. Aún así, la correlación existente entre el daño causado a pulmones y los niveles de anti-ETA es muy baja, por lo que se sugiere que *in vivo* se seleccionan mutantes en *toxA* que producen ETA con bajos niveles enzimáticos o son deficientes en la producción de ETA disminuyendo su toxicidad (Gallant *et al.*, 2000).

2.1.2.2.2. Elastinas LasA y LasB.

Ambas elastinas son capaces de degradar la elastina, proteína que se encuentra presente en una gran cantidad de tejidos en el ser humano y que les confiere elasticidad; en el pulmón permite los movimientos de expansión-contracción y de igual manera los permite en venas, arterias y vasos sanguíneos. A la destrucción de la elastina realizada por las enzimas que la

degradan se le denomina actividad elastolítica la cual está fuertemente asociada con infecciones invasivas y hemorragias pulmonares causadas por la presencia de *P. aeruginosa*.

Las elastasas LasA y LasB presentan actividad elastolítica independiente (Galloway, 1991) pero en conjunto actúan sinérgicamente. Ambas son metaloproteasas que contienen un ión de zinc en su sitio activo y degradan no únicamente elastina sino algunas proteínas más. La elastasa LasB tiene actividad proteolítica 10 veces más fuerte que la proteasa alcalina producida por *P. aeruginosa* y 4 veces más que la Tripsina para degradar caseína (Galloway, 1991). Por otra parte, la elastasa LasA es una serina proteasa que posee actividad estafilolítica (Kessler *et al.*, 1993). Como mencioné anteriormente, LasA y LasB actúan de manera sinérgica ya que LasA rompe la elastina lo cual la hace mucho más susceptible de ser degradada por otras proteasas tales como LasB (Galloway, 1991).

El proceso de transporte de ambas elastasas difiere ligeramente, por lo que describiré el proceso común. Ambas son producidas como precursores en el citoplasma denominados preproenzimas (Gustin *et al.*, 1996; Kessler and Safrin, 1988), evitando de esta manera que actúen en el interior celular. Las preproenzimas poseen en el extremo N-terminal un péptido señal (prepéptido) y entre el prepéptido y la proteína madura un propéptido. El prepéptido ayuda en el proceso de transporte de la preproenzima hacia el interior del espacio periplásmico en donde se escinde dejando únicamente una proenzima. El propéptido actúa como una chaperona intramolecular que auxilia en el correcto plegamiento de la elastasa (Braun *et al.*, 1996; McIver *et al.*, 1991). Posteriormente se lleva a cabo un proceso de autoproteólisis en el que el propéptido ayuda en su división para dejar a la elastasa en su estado maduro. Este proceso se realiza durante o inmediatamente después del transporte de la proteína a través de la membrana externa, mientras tanto permanece covalentemente unido a la enzima madura. LasA puede seguir dos rutas durante el proceso de transporte, en la primera requiere de LasB para escindir el propéptido, o bien, requerir de una proteasa lisina-específica. Tanto para LasA como para LasB, el propéptido puede ser degradado por la misma LasB.

Ambas elastasas se han encontrado en el esputo de pacientes con fibrosis quística durante la exacerbación pulmonar (Jaffar-Bandejee *et al.*, 1995), pero no es claro el rol de LasB durante la fase crónica de esta enfermedad. Se sugiere que en esta etapa los

anticuerpos de LasB neutralizan la elastasa aunque no es claro aún. Sin embargo la importancia de LasB se debe a que también degrada fibrina y colágeno (Heck *et al.*, 1990) e inactiva globulina G y A (Heck *et al.*, 1990), lisozimas del tracto respiratorio (Jacquot *et al.*, 1985) y componentes complementarios (Hong and Ghebrehiwet, 1992) tales como: sustancias involucradas en la protección de vías aéreas contra proteasas (inhibidores de α -1-proteinasa por ejemplo). Así mismo degrada proteínas surfactantes humanas (SP-A, SP-D) que juegan un rol importante en la respuesta inmune innata y en la regulación de los procesos inflamatorios. La degradación de SP-A y SP-D disminuye la respuesta del sistema inmune e incrementa los procesos inflamatorios del tracto respiratorio. En el caso de LasA, su importancia causa controversia ya que en algunos estudios utilizando un modelo animal de ratón, mutantes deficientes en la producción de LasA parecen disminuir su virulencia con respecto a la cepa silvestre; sin embargo esto no parece ser así en modelos de infección de ratón o conejo en donde mutantes deficientes en la producción de LasA no parecen disminuir su virulencia con respecto a la cepa silvestre (Hobden, 2002). Para LasB esto ha sido claramente demostrado, ya que utilizando diferentes modelos animales (ratones quemados, ratas con neumonía aguda crónica y ratones con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (sepsis)) mutantes deficientes en la producción de LasB son significativamente menos virulentas que la cepa silvestre (Nicas *et al.*, 1985; Tamura *et al.*, 1992; Tang *et al.*, 1996).

2.1.2.2.3. Fosfolipasa C

P. aeruginosa produce la Fosfolipasa C hemolítica (HPLC por sus siglas en inglés); se ha demostrado que purificada induce permeabilidad vascular, daño orgánico y la liberación de mediadores inflamatorios (Berk *et al.*, 1987) tales como trombocitos humanos, neutrófilos y basófilos. También reduce la producción de IL-8 de monocitos (Konig *et al.*, 1996) los cuales fungen como activadores de los neutrófilos. Su administración intravenosa produce necrosis tubular epitelial en riñones generando hematuria; su administración intraperitoneal genera hepatonecrosis con infiltración celular (Meyers *et al.*, 1992) y suprime la respiración en neutrófilos (Terada *et al.*, 1999) interfiriendo a la proteína cinasa C. Se ha sugerido que la Fosfolipasa C incrementa la sobrevivencia de *P. aeruginosa* en condiciones caracterizadas por una gran cantidad de neutrófilos. Su rol como factor de virulencia ha sido demostrada por

medio de mutantes deficientes de HPLC, las cuales resultaron menos virulentas que la cepa silvestre en modelos de ratón (Ostroff *et al.*, 1989 and Rahme *et al.*, 1995).

2.1.2.2.4. Proteasa IV.

Esta proteasa es una serina-proteasa (Engel *et al.*, 1998), su acción principal es la de degradar componentes del complemento C1q y C3 de la inmunoglobulina G del sistema inmune, así como fibrinógeno, plasmina y plasminógeno. Como en otras proteasas de *P. aeruginosa*, en la proteasa IV la autodigestión juega un papel importante en el proceso de maduración de ésta (Traidej *et al.*, 2003). Este factor de virulencia es sumamente importante en las infecciones de córnea por *P. aeruginosa* y se ha demostrado que en modelos de ratón y conejo mutantes deficientes en la producción de proteasa IV son menos virulentas que la cepa silvestre (Engel *et al.*, 1997 y O'Callaghan *et al.*, 1996).

2.1.2.2.5. Lipasas.

P. aeruginosa produce dos lipasas: LipA y LipC y como la mayoría de las enzimas transportadas por la vía de secreción tipo II, su maduración involucra la formación de un enlace bisulfito que es catalizado por DsbA (Urban *et al.*, 2001). Las lipasas juegan un rol importante como factor de virulencia porque degradan (en acción conjunta con HPLC) el principal lípido surfactante del pulmón: dipalmitoil-fosfatidil-colina (Konig *et al.*, 1996 y Martínez *et al.*, 1999). Tanto HPLC como las lipasas producidas por *P. aeruginosa*, provocan procesos inflamatorios agudos en sus hospederos (Konig *et al.*, 1996).

2.1.2.3. Factores de virulencia secretados por Sistema de Secreción Tipo III: Exoenzimas S, T, Y y Exotoxina U.

A diferencia de los exoproductos descritos anteriormente, los cuales pueden actuar de manera distal sobre células eucariontes, existen otros exoproductos de *P. aeruginosa* que requieren del contacto estrecho con células eucariontes para tener efecto sobre éstas, entre estos exoproductos están: Exoenzimas S, T, Y y la Exotoxina U. Estas exoproteínas son secretadas por la Vía de Secreción Tipo III que utiliza una maquinaria de inyección introduciendo las moléculas efectoras dentro del citoplasma de las células blanco (Barbieri,

2000), por lo que el contacto cerrado con éstas es vital. Este proceso requiere de tres pasos: secreción (*psc* y *pcr*), translocación (*popD* y *popB*) y regulación (*exs*) y se encuentran juntos en un mismo locus llamado el regulón de la exoenzima S en el cromosoma de *P. aeruginosa* (Frank, 1997; Yahr *et al.*, 1997; Frithz *et al.*, 1998). Se ha sugerido que el locus estructural, secretor y regulador del aparato de secreción tipo III está controlado con la expresión de los genes efectores (*exoS*, *exoT* y *exoU*) por un único regulador transcripcional denominado ExsA en respuesta a varios factores ambientales como bajos niveles de calcio y el contacto con el hospedero (Yahr *et al.*, 1997). Además CyaB, adenilato ciclasa que está asociada a membrana, controla la expresión del aparato de secreción Tipo III vía Vfr y AMPc.

2.1.4. Otros Factores de Virulencia.

2.1.4.1. Ramnolípidos.

Fosfolipasa C y los Ramnolípidos son las dos hemolisinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa*. Se ha propuesto que ambas trabajan de manera sinérgica para romper lípidos y contribuyen a la invasión de tejido por sus efectos citotóxicos. La producción de ramnolípidos fue descrita por Jarvis y Johnson (1949). El operón que los produce es *rhIABRI*, los dos últimos genes (*rhIR* y *rhII*) codifican para una proteína reguladora tipo LuxR y para una sintasa N-acil-homoserina lactona tipo LuxI, ambos componentes del circuito Quorum Sensing (Ochsner *et al.*, 1994).

Los ramnolípidos se componen de una parte de ácidos grasos hidrofóbica y otra hidrofílica compuesta por residuos de ramnosa y los componentes precursores de éstos (HAAs) también son liberados a través de la acción de este operón (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que los ramnolípidos inhiben el transporte mucociliar y la función ciliar del epitelio respiratorio humano (Read *et al.*, 1992). También se ha sugerido que su producción juega un rol importante en la formación de comunidades microbianas formadoras de biopelículas. Mutantes del gen *rhIB* que codifica para la ramnosiltransferasa son incapaces de producir ramnolípidos, así como las deficientes en *RhIA*, la sintasa de HAAs.

2.1.4.1. Piocianina.

La piocianina es un pigmento activo reductor, fenazina, que genera especies reactivas al oxígeno debido al ciclo reductor intracelular. La piocianina se reduce por una molécula de NAD(P)H que puede reaccionar con el oxígeno molecular produciendo superóxido y peroxidasa de hidrógeno. Estos productos someten a las células del hospedero a un estrés oxidativo.

2.1.4.2. Sideróforos.

P. aeruginosa secreta dos tipos de sideróforos cuando se encuentra en condiciones limitadas de hierro: pioverdina y pioquelina y ambas compiten con la transferrina por el hierro. Éstos sideróforos quelan los iones de hierro del ambiente y forman complejos de hierro::sideróforos y entran en la bacteria por medio de receptores específicos tales como FpvA (Lamont *et al.*, 2002; Beare *et al.*, 2003). Dentro de la bacteria el hierro es liberado e incorporado a las proteínas. Por otra parte, la pioverdina regula la producción de al menos tres factores de virulencia: ETA, una endoproteasa PrpL y a sí misma (Lamont *et al.*, 2002). La producción de las proteínas receptoras del complejo hierro/sideróforo está regulada negativamente por el regulador Fur (Vasil and Ochsner, 1999).

2.1.4.3. Ácido cianhídrico.

El Ácido cianhídrico es sumamente tóxico para la célula ya que bloquea a la citocromo oxidasa y detiene la respiración mitocondrial, produce una muerte por parálisis rápida en *Caenorhabditis elegans* (Gallagher and Manoil, 2001), en el humano participa en la destrucción tisular.

3. Quorum Sensing

Como se describió anteriormente, *P. aeruginosa* expresa varios factores de virulencia que contribuyen a su alta patogenicidad, algunos de estos son expresados de una manera dependiente de la densidad celular a lo que se le denomina Quorum-Sensing (QS). El QS permite a la bacteria coordinar su comportamiento poblacional y para ello utiliza moléculas señalizadoras llamadas autoinductores (AIs).

3.1. Quorum-Sensing en *Vibrio fischeri*

El control por QS implica la comunicación entre células y fue descrito primero en *Vibrio fischeri*, donde la bioluminiscencia depende de la densidad poblacional (Fuqua *et al.*, 1994). En sus estudios Fuqua y colaboradores determinaron que la densidad poblacional es censada por la concentración del autoinductor en el interior celular. Los autoinductores se sintetizan a niveles basales y se acumulan en el ambiente extracelular e intracelular hasta una concentración crítica, (Figura I2). El autoinductor se une a una proteína reguladora (proteínaR) formando un complejo ProteínaR/autoinductor que activa o reprime la transcripción de genes blanco. En *Vibrio fischeri* el sistema consiste de la proteína reguladora, LuxR, y su respectivo autoinductor N-3-(oxohexanoil) homoserina lactona (3O-C6-HSL) que es sintetizada por LuxI (sintasa). Cuando LuxR forma un complejo con el autoinductor (LuxR/3O-C6-HSL) activa la transcripción del operón de bioluminiscencia *luxICDABEG* y forma un circuito de activación de la transcripción de LuxI para la rápida formación de 3O-C6-HSL (Fuqua *et al.*, 1994). Posterior a la descripción de este sistema en *V. fischeri*, se han descrito sistemas similares en otras bacterias Gram-negativas que incluso poseen más de un sistema LuxR/LuxI (Lazdunski *et al.*, 2004). La posibilidad de formar complejos proteínaR::autoinductor depende de la especificidad de unión con las acil-homoserina lactonas (AHSL) por lo que Lazdunski y colaboradores proponen que de ello depende la comunicación intraespecies. Sin embargo el paradigma de la cascada de regulación en *V. fischeri* no es simple. Esta bacteria produce tres moléculas señal: 3-oxo-hexanoil-HSL sintetizado por LuxI, Octanoil-HSL sintetizado por AinS y Furanosil borato diéster sintetizado por LuxS. El furanosil borato diéster actúa como señal para un sistema de dos componentes compuestos por LuxP/LuxQ (cinasa sensora y regulador de respuesta, respectivamente) los cuales son fosforilados en ausencia de la molécula señal activando el sistema y permitiendo la fosforilación de LuxU y LuxO (activador transcripcional). LuxO

fosforilado activa la transcripción de sRNAs inhibiendo la producción de la proteína LitR (LitR actúa como activador transcripcional de *luxR*). Sin embargo, por otra vía, AinS cataliza la síntesis de C8-HSL el cual funciona como señal de la proteína de membrana LuxN (sensor cinasa) la cual fosforila a LuxU y se desencadena la cascada de activación y represión transcripcional arriba señalada. A su vez, LuxR (proteína reguladora) es capaz de unirse tanto a 3-O-C6-HSL como a C8-HSL para funcionar como activador transcripcional del operón *luxCDABE*, Figura I2.

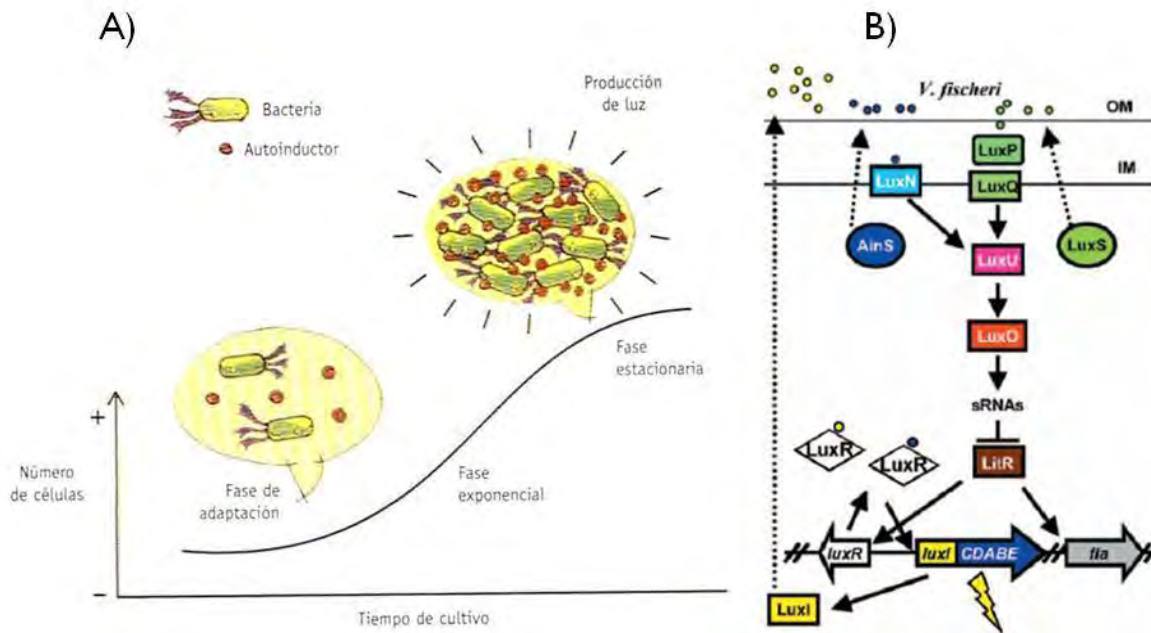


Figura I2. Quorum Sensing. Es una respuesta sensora de quórum donde la densidad poblacional es detectada por las concentraciones de moléculas señalizadoras que se unen a proteínas reguladoras y activan o reprimen la transcripción de genes blanco en respuesta a estímulos del medio ambiente. La cascada de regulación para la expresión denso-dependiente de la proteína reguladora LuxR implica una serie de reacciones de fosforilación.

3.2. Quorum-Sensing en *Pseudomonas aeruginosa*.

En *P. aeruginosa* se han descrito dos sistemas tipo LuxR/LuxI: los sistemas *las* y *rhl*, cada uno de ellos controla la expresión de diferentes factores de virulencia, por lo que su eficaz desempeño es vital para el establecimiento y desarrollo poblacional de la bacteria.

3.2.1. Sistemas *las* y *rhl* y sus autoinductores.

El sistema *las* está compuesto por la proteína reguladora LasR y LasI que codifica para la sintasa productora de N-3-(oxo-dodecanoil)-homoserina lactona (3O-C12-HSL) mientras que el sistema *rhl* está compuesto por la proteína reguladora RhIR y RhII, sintasa que produce el autoinductor N-butanoyl-homoserina lactona (C4-HSL). Tanto LasR como RhIR son ortólogos de LuxR, activador transcripcional en *V. fischeri*, poseen un dominio en la región amino-terminal donde se une el autoinductor y otro dominio en la región carboxilo-terminal donde se une a la secuencia blanco en el DNA cromosomal (Fuqua *et al.*, 1994 y Latifi *et al.*, 1995). La especificidad de unión entre la proteína reguladora y el autoinductor es alta y hay evidencias de que la interacción con el autoinductor induce la oligomerización (Kiratisin *et al.*, 2002; Lamb *et al.*, 2003). Los complejos formados por la proteína reguladora, sea LasR o RhIR, y sus respectivos autoinductores se unen a secuencias específicas del DNA cromosomal bacteriano que se encuentran relativamente bien conservadas y a las que se les denomina cajas *las*. Éstas se localizan río arriba del sitio de inicio transcripcional, en la región promotora de cada gen (Whiteley and Greenberg, 2001), Figura I3.

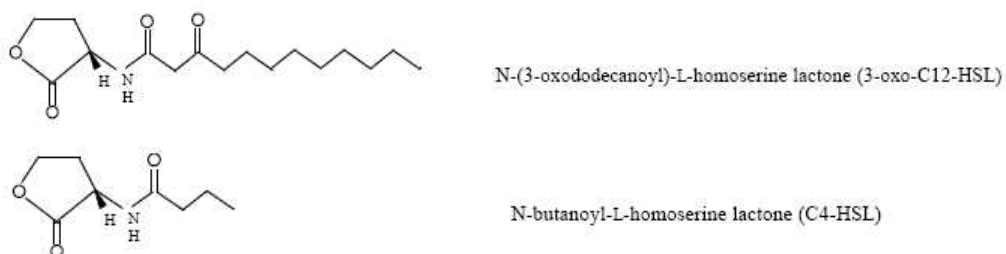


Figura I3. Moléculas de la familia de las Homoserina Lactonas. Son las moléculas señalizadoras del QS denominados autoinductores (AIs). Se producen en niveles basales hasta llegar a una concentración crítica y forman complejos con las proteínas reguladoras para activar o reprimir la transcripción de genes blanco. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* existen dos: 3-(oxododecanoil)-Homoserina Lactona (3O-C12-HSL) y N-Butiril-Homoserina Lactona (C4-HSL).

Ambos sistemas reguladores no son independientes, más bien trabajan de manera jerárquica donde el sistema *las* ejerce control transcripcional y post-transcripcional sobre el sistema *rhl* (Latifi *et al.*, 1996; Pesci and Iglewski, 1997a,b; de Kievit *et al.*, 2002), por ejemplo en la regulación de la producción de ramnolípidos.

3.2.2. El tercer ortólogo de LuxR en *P. aeruginosa*.

Se encontró un tercer ortólogo de LuxR en *P. aeruginosa* al que se le denominó qscR (Quorum-Sensing cognate repressor) y se ha demostrado que reprime la transcripción de algunos de los genes regulados por QS entre los que se encuentran *lasI*, *rhlI* (Chungani *et al.*, 2001; Ledgham *et al.*, 2003). Ledgham y colaboradores demostraron que QscR interactúa con LasR y RhIR y forma heterodímeros cuando los niveles de concentración de los autoinductores se encuentran bajos, estas interacciones de LasR::QscR o RhIR::QscR podrían inhibir la activación o represión de algunos genes regulados por los sistemas *las* o *rhl*. También se ha encontrado que QscR interacciona con 3O-C12-HSL pero no se ha definido el papel del regulador QscR en el regulón de QS.

3.2.3. PQS una tercera molécula señal.

Se ha descrito una tercera molécula señalizadora: 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS-*Pseudomonas* quinolone signal), se ha postulado que actúa como un enlace entre los sistemas *las* y *rhl* (Pesci and Iglewski, 1999; McKnight *et al.*, 2000). De acuerdo a lo descrito por estos grupos de trabajo, se requieren tanto LasR como RhIR, la primera para sintetizar PQS y la segunda para bioactivar a la molécula señal. Para la síntesis de PQS se requiere el precursor HHQ (4-hidroxi-2-heptilquinolina) perteneciente a la familia de las HAQs (4-hidroxi-2-alkilquinolinas) (Déziel *et al.*, 2004). La síntesis de HHQ requiere de la activación transcripcional de los operones *pqsABCD* y *phnAB*. La conversión de HHQ a PQS requiere del gen *pqsH*, regulado por el sistema *las* (Déziel *et al.*, 2004). La biosíntesis de PQS requiere del regulador transcripcional MvfR y se ha demostrado que éste es regulado por el sistema *las*. PQS regula positivamente a rhIR, actúa como quelante de hierro, posee la capacidad de alterar la membrana, por lo que está ligado a la formación de vesículas membranales. Esta molécula señal se une a la proteína reguladora PqsR, complejo que está involucrado con la homeostasis de hierro y activa los operones *pqsABCDE* y *phnAB* (Gallagher *et al.*, 2002; McGrath *et al.*, 2004; Déziel *et al.*, 2005), sin embargo PqsE no se requiere para la síntesis de PQS pero una mutante *pqsE* no produce pirocianina, lectina (PA-IL) y disminuye la cantidad de ramnolípidos y elastasa (*lasB*) producidos, por lo que se considera que se requiere para una óptima expresión de estos metabolitos; asimismo es avirulenta en ratón (Farrow III *et al.*, 2008).

3.2.4. Regulación del circuito Quorum-Sensing

La regulación del circuito QS es muy compleja e involucra a varios reguladores transcripcionales. El sistema *las* fue el primer sistema QS descrito en *Pseudomonas aeruginosa* que regula la expresión de factores de virulencia (Gambello *et al.*, 1993). Este sistema, que se encuentra en la cima de jerarquía en la regulación por QS, regula la expresión de algunos factores de virulencia como: las elastasas LasA, LasB, la Exotoxina A (*toxA*), la Proteasa alcalina (*apr*), el Ácido cianhídrico (*hcnABC*), la Vía de secreción Tipo II (*xcpR*, *xcpP*), y RsaL (*rsaL*), (de Kievit and Iglewski, 2000; Lazdunski *et al.*, 2004). Éste último reprime la transcripción temprana de *lasI* cuando hay bajas densidades celulares (de Kievit *et al.*, 1999; Hentzer *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Este sistema es controlado positivamente, a su vez, por un regulador de respuesta global llamado GacA que actúa en conjunto con GacS (cinasa sensora) y que juntos conforman un sistema de dos componentes. Por otra parte, Vfr, homólogo del regulador transcripcional CRP, es necesario para la transcripción de *lasR* e interviene en la regulación de *rhlR* (Medina *et al.*, 2003).

El sistema *rhl* regula la producción de ramnolípidos (*rhlA*, *rhlB*), Piocianina y Lectina (adhesina, *lecA*), y se requiere para la óptima expresión de *lasA*, *lasB* y *apr* (Pearson *et al.*, 1997), Figura I4.

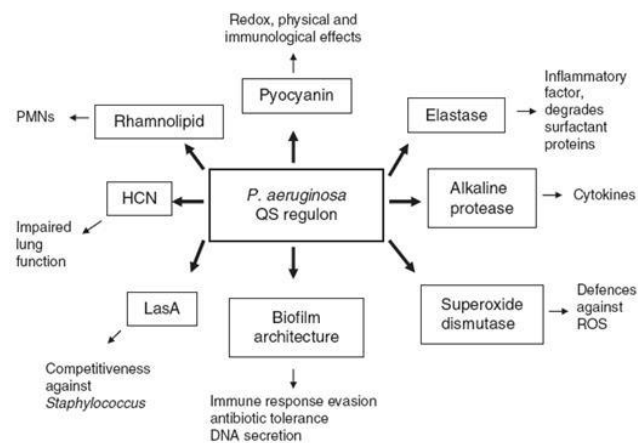
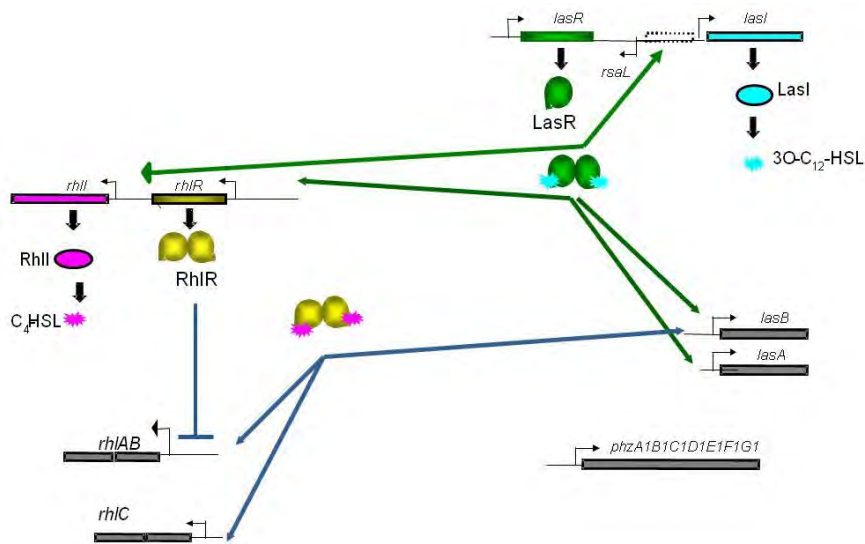


Figura I4. Producción de Factores de Virulencia por *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bacteria produce varios factores de virulencia que contribuyen a su alta patogenicidad. Todos ellos están directa o indirectamente regulados por Quorum Sensing, (Winstanley and Fotherergill, 2008.)

La producción de ramnolípidos se realiza mediante la respuesta de Quórum Sensing (QS) y es altamente regulada, requiere de dos autoinductores: 3-(oxododecanoil)-homoserina lactona y N-butanoil-homoserina lactona (ver adelante), que son sintetizados por LasI y RhII respectivamente. 3O-C12-HSL se une a LasR (proteína reguladora) y se ha demostrado que este complejo promueve la transcripción de varios genes blanco, entre ellos *rhIR* (de Kievit *et al.*, 2002; Latifi *et al.*, 1996; Medina *et al.*, 2003; Pesci *et al.*, 1997; Schuster and Greenberg, 2006; Soberón-Chávez *et al.*, 2005); por otra parte C4-HSL se une a RhIR (proteína reguladora) que promueve la transcripción de varios genes, entre ellos el operón *rhIAB* y *rhIC* (Ochsner *et al.*, 1994; Ochsner and Reiser, 1995; Rahim *et al.*, 2001).

Se han realizado varios análisis de transcriptoma para identificar los genes regulados por los sistemas *las* y *rhl*, para lo cual se realizaron estudios de microarreglos con la cepa silvestre (PAO1) y mutantes isogénicas *lasI/rhII* y *lasR/rhIR*. Los resultados indican que entre el 6 y 10% de los genes de *P. aeruginosa* son controlados por Quorum Sensing (Hentzer *et al.*, 2003; Schuster *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2003). Existen discrepancias entre los 3 estudios y se sugiere se deben a diferencias experimentales. Sin embargo, entre los resultados más importantes se concluyó que algunos genes involucrados en procesos celulares básicos como replicación, división celular, biosíntesis de aminoácidos, son regulados por QS; también se enfatiza el hecho de que los factores de virulencia son regulados por esta vía, sobre todo aquellos relacionados con la colonización, establecimiento, diseminación y destrucción de tejido. Además se sugiere que muchos de los genes regulados por QS se encuentran bajo una regulación indirecta de los sistemas *las* o *rhl* ya que estos genes codifican para reguladores conocidos o putativos. Hay evidencia de que muchos de los genes regulados por QS se encuentran regulados de una manera indirecta. pues algunos genes carecen de cajas *las* así pues es posible que no se estime correctamente el número de genes regulados directamente por estos sistemas. Cabe recordar que las cajas *las* fueron determinadas mediante sistemas bioinformáticos que condujeron a la secuencia consenso en las regiones promotoras de genes conocidos por estar bajo la regulación del sistema *las*. Sin embargo se han caracterizado *in vitro* genes carentes de cajas putativas *las* los cuales son

activados por el complejo LasR/3O-C12-HSL o bien, genes que poseen cajas putativas *las* y que no son activados por este complejo (Schuster *et al.*, 2004), Figura I5.



Soberón-Chávez *et al.*, 2005.

Figura I5. Regulación por Quorum Sensing. El circuito de Quorum Sensing consta de dos sistemas: *las* y *rhl* que conforman una cascada jerárquica de regulación. El sistema *las* consta de la proteína reguladora LasR y su respectivo autoinductor 3O-C12-HSL mientras que el sistema *rhl* consta de la proteína reguladora RhlR y su autoinductor C₄-HS, (Winstanley and Fotherergill, 2008).

ANTECEDENTES

En el grupo de estudio de genética molecular de la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* dirigido por la Dra. Gloria Soberón Chávez, la M. en C. Abigail González construyó un modelo artificial que consistió en clonar en el promotor del gen *lacZ* entre las regiones -10 y -35 las cajas *las* de algunos genes de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura A1). El objetivo del modelo era evaluar la unión al DNA de los reguladores transcripcionales LasR o RhIR mediante la competencia con la RNA polimerasa. Esto es, cuando el complejo LasR/3O-C12-HSL ó C4-HSL se une al DNA la RNA polimerasa no se puede unir al promotor y transcribir *lacZ*. Por el contrario, si el complejo LasR/3O-C12-HSL ó RhIR/C4-HSL no reconocía la secuencia de la caja *las*, entonces la RNA polimerasa podría transcribir libremente *lacZ*. Cuando se realizaron los ensayos para determinar la unión al DNA en la caja *las* del gen *phzA1*, los resultados indicaron que efectivamente la presencia del complejo LasR/3O-C12-HSL disminuían los niveles transcripcionales con respecto a la ausencia del complejo pero dichos niveles se restituían la máximo cuando se adicionaban ambos autoinductores: 3O-C12-HSL y C4-HSL, Figura A2.

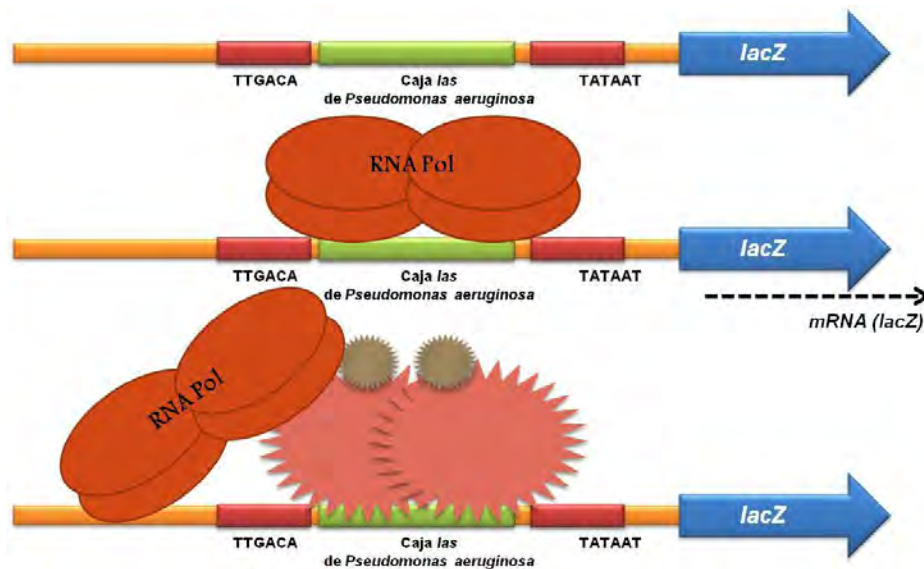


Figura A1. Modelo artificial. Se clonó la caja *las* del gen *phzA1* entre las regiones -10 y -35 del promotor para verificar la competencia por la unión al DNA entre el complejo LasR::3O-C12-HSL y la RNA polimerasa. En el modelo, la presencia del complejo LasR/ 3O-C12-HSL ó RhIR/C4-HSL disminuye los niveles de expresión de *lacZ*.

ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA MEDIADA POR LasR y RhIR EN PRESENCIA DE 3OC12HSL, C4HSL O AMBOS.

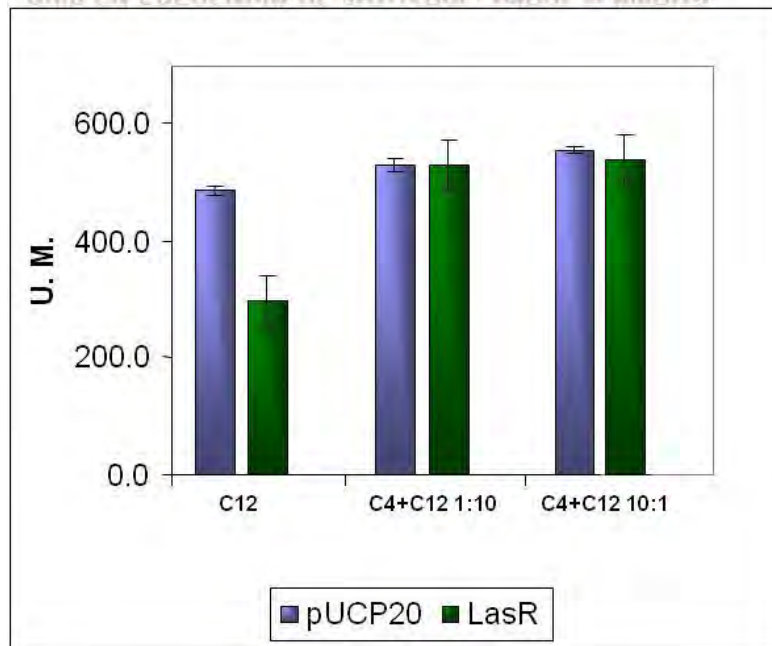


Figura A2. Evaluación de competencia de la caja *las* del gen *phzA1*. La caja *las* del gen *phzA1* se clonó entre las regiones -10y -35 del promotor para verificar la competencia de unión entre el complejo LasR::3O-C12-HSL y la RNA polimerasa. La presencia del complejo disminuyó los niveles de expresión de LacZ' en cerca de un 50%. Cuando se adicionaron ambos autoinductores (3O-C12-HSL y C4-HSL) en presencia de LasR los niveles de expresión de LacZ' se recuperaron al 100% lo que sugiere que la presencia de C4-HSL impide la unión del complejo LasR/3O-C12-HSL a la caja *las* del gen *phzA1*; se utilizó el vector pUCP20 como control de la transcripción ya que los complejos LasR/3O-C12-HSL ó RhIR/C4-HSL no reconocen la región del promotor y permiten la libre transcripción por la RNA polimerasa.

Por otro lado, la regulación transcripcional del gen *lasB* de *P. aeruginosa* por el complejo LasR/3O-C12-HSL ha sido bien estudiada. La caracterización de la región promotora de *lasB* la realizaron Rust y colaboradores (1996) quienes determinaron el sitio de inicio de la transcripción el cual se encuentra en la posición -141 con respecto al codón de inicio y la presencia de dos operadores potenciales (OP1 y OP2) los cuales se encuentran centrados en la posición -42 y -102 del sitio de inicio de la transcripción respectivamente. El OP1 es la secuencia más parecida al operador *lux* de *V. fischeri* con 20 nt, mientras que el OP2 sólo posee 19 nt, Figura A3.

Este grupo realizó una serie de mutaciones sitio dirigidas en los operadores de *lasB* en las posiciones 3 y 5 (C y G respectivamente) y en la posición 18 (G) para determinar en *P. aeruginosa* la relevancia de cada uno de ellos en la activación de la expresión del gen. En *V.*

fischeri se había reportado que mutaciones puntuales en las posiciones 3 y 5 disminuyeron en un 97% la expresión (Baldwin *et al.*, 1989).

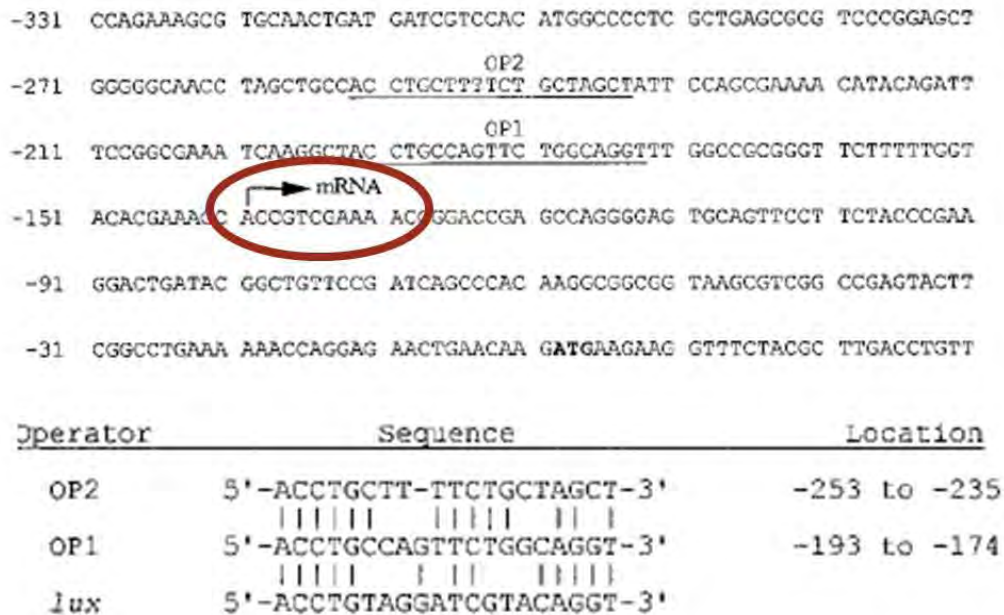


Figura A3. Región reguladora del gen *lasB* de *Pseudomonas aeruginosa*. El sitio de inicio de la transcripción se encuentra situado en la posición -141 con respecto al codón de inicio. La región reguladora de *lasB* posee dos secuencias que son dos operadores potenciales: OP1 y OP2. La secuencia del OP1 es muy similar al operador *lux* de *V. fischeri* con 20 nt de largo mientras que el OP2 sólo posee 19 nt. La similitud de ambos operadores con respecto al operador *lux* es para el OP1 de 13 nt y para el OP2 sólo es de 10 (Rust *et al.*, 1996).

Los resultados demostraron que cuando se reemplazan la C y G de las posiciones 3 y 5 del OP1 por T y C respectivamente, los niveles de expresión caen en un 99.7%; en la sustitución de la posición 5 de una G por una C la expresión disminuye un 26.5%; la sustitución de una C por una T en la posición 3 del OP1 produce una disminución de la expresión del 97.5%; el reemplazo de una G por una A en la posición 18 del OP1 también produce una disminución en los niveles de expresión del 99.6%. Mientras que el reemplazo de las posiciones 3 y 5 del OP2 sólo produce una caída de los niveles de expresión del 20% (Figura A4).

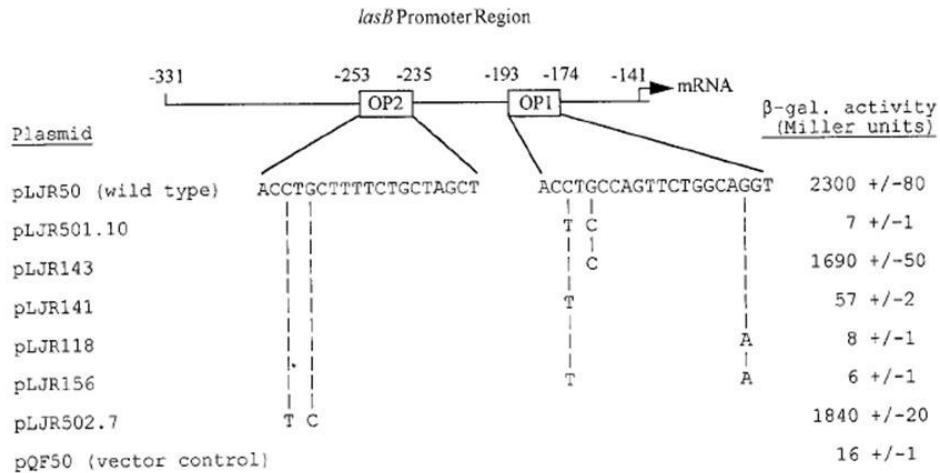


Figura A4. Efectos de mutaciones sitio dirigidas del OP1 y OP2 sobre la expresión del promotor del gen *lasB* de *Pseudomonas aeruginosa*. Se realizaron mutaciones sitio dirigidas en las posiciones 3, 5 y 18 del OP1 y en las posiciones 3 y 5 del OP2. Las mutaciones realizadas en las posiciones 3 y 5 del OP1 generaron una disminución de la expresión del 93%, la sustitución de la posición 3 produjo una caída del 97.5% mientras que la de la posición 5 sólo la redujo en un 22.5%. La sustitución de la posición 18 del OP1 también resultó en una disminución de más del 99%. Las sustituciones realizadas en las posiciones 3 y 5 del OP2 sólo produjeron una reducción en los niveles de expresión del 20% (Rust *et al.*, 1996).

Posteriormente Anderson y colaboradores (1999) realizaron una serie de sustituciones de los dos operadores del gen *lasB* de *P. aeruginosa*. Ellos sustituyeron: el OP2 por una secuencia al azar del mismo número de nt; el OP2 por el OP1 teniendo 2 OP1 (2OP1) en la región reguladora; el OP1 por el OP2 teniendo 2 OP2 (2OP2); sustituyen las posiciones 17 y 18 del OP2 y, finalmente, insertaron 5 y 10 pb entre el OP1 y el OP2. Los resultados reportados indican que la sustitución del OP2 por una secuencia al azar disminuye los niveles de expresión en cerca de un 50%; la sustitución del OP2 por el OP1 (2OP1) eleva los niveles de expresión en más de un 500%; la sustitución del OP1 por el OP2 (2OP2) produce una disminución en los niveles de expresión de más del 90%; la sustitución de las bases de las posiciones 17 y 18 reduce los niveles de expresión en cerca de un 80% y, la inserción de 5 nt entre el OP1 y el OP2 produce una disminución del 25% mientras que la inserción de 10 nt la produce del 85%. Esto parece indicar que el operador óptimo para la activación de la transcripción del gen *lasB* por LasR/3O-C12-HSL es el OP1 y el OP2 es un operador subóptimo que también es regulado por LasR/3O-C12-HSL Figura A5.

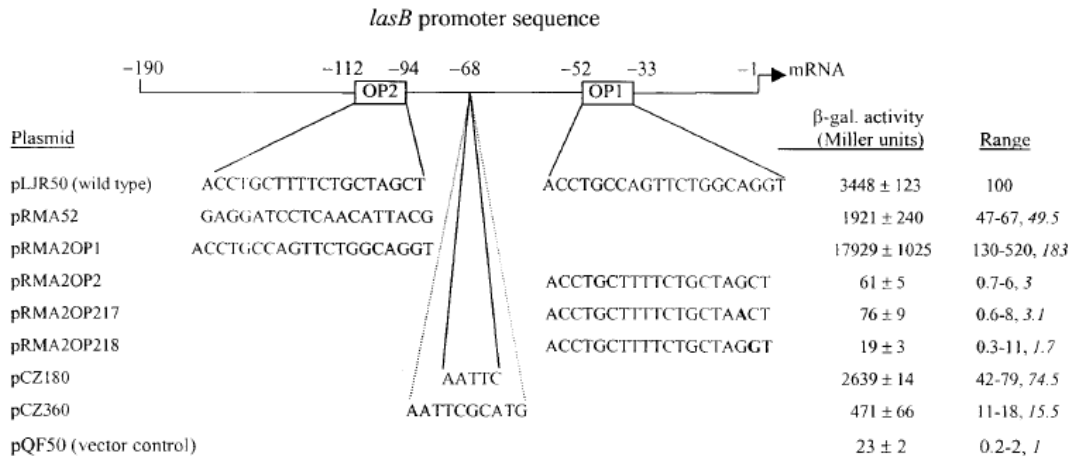


Figura A5. Efectos de la sustitución del OP1 y OP2 en la región promotora del gen *lasB* de *P. aeruginosa*. Se realizaron sustituciones del OP2 por una secuencia al azar, el OP2 por el OP1 y se sustituyeron las bases de las posiciones 17 y 18 del OP1. Los resultados parecen indicar que el operador óptimo es el OP1 mientras que el OP2 es subóptimo en la regulación dependiente de LasR/3O-C12-HSL (Andersen *et al.*, 1999).

Los mismos vectores construidos con los operadores OP1 u OP2 reemplazados fueron transformados en PAO1 (cepa silvestre) y en las mutantes *rhIR*⁻ y *rhII*⁻. Los resultados se observan en la Tabla A1.

TABLE 3. Effects of *P. aeruginosa* regulatory mutant backgrounds on operator-mediated *lasB* induction

Plasmid	Mean β-galactosidase activity (Miller units) ± SD ^a			
	PAO1 (parent)	PAO1 (<i>lasR</i> mutant)	PDO100 (<i>rhII</i> mutant)	PDO111 (<i>rhIR</i> mutant)
pQF50	48 ± 3	41 ± 1 (1)	72 ± 4 (2)	38 ± 1 (1)
pLJR50	3,203 ± 348	30 ± 2 (1)	135 ± 3 (4-19, 12.5)	485 ± 13 (12-15)
pRMA52	1,641 ± 57	21 ± 1 (1)	341 ± 17 (11-24)	91 ± 11 (6-7)
pRMA2OP1	4,148 ± 204	49 ± 4 (1-2)	824 ± 35 (22-32, 29)	425 ± 4 (13-25, 18)
pRMA2OP2	92 ± 8	ND	158 ± 6 (2-23, 3.5)	62 ± 5 (1-3)
pRMA2OP217	136 ± 2	ND	89 ± 7 (3-4)	316 ± 24 (7-10)
pRMA2OP218	127 ± 18	ND	48 ± 6 (2-3)	82 ± 5 (3-7)

^a Activity is given in Miller units. Values in parentheses are the ranges of activity expressed as percentages of PAO1(pLJR50) and the median percentages in italics. Medians were calculated from 12 determinations from a total of four independent experiments by using PAO1(pLJR50) as an internal control. ND, not determined.

Tabla A1. Efectos sobre el operador de *lasB* en PAO1 y sus mutantes *rhIR*⁻ (PDO111) y *rhII*⁻ (PDO100). La disminución en los niveles de expresión en la mutante *lasR* se deben al hecho de que la activación del gen *lasB* está dada por el complejo LasR/3O-C12-HSL; sin embargo la disminución en los niveles de expresión en la mutante *rhII* pueden ser explicados debido a que en la ausencia del respectivo autoinductor de RhIR (C4-HSL) éste actúa como represor de *lasB*; por otro lado, la disminución en los niveles de expresión en la mutante *rhIR* tendrían explicación si C4-HSL está interfiriendo con la unión del complejo LasR/3O-C12-HSL a su secuencia blanco o bien, si el C4-HSL interfiere con la formación de éste complejo (Andersen *et al.*, 1999).

En esta tabla se puede observar que los niveles de expresión dados por el plásmido pLJR50 (silvestre) disminuyen en la mutante en *lasR* en cerca de un 99% debido a que la activación de la transcripción del gen *lasB* está regulado por el sistema *las*; la disminución del 96% en la mutante en *rhII* puede deberse a que la proteína reguladora RhIR sin su respectivo autoinductor actúa como un represor sobre *lasB*; y la disminución del 85% en la mutante *rhIR* podría ser explicada a la luz del hecho de que el C4-HSL puede estar impidiendo una activación de *lasB* por el complejo LasR/3O-C12-HSL.

HIPÓTESIS Y OBJETIVO

La evidencia sumada a los resultados obtenidos en el laboratorio fue la base sobre la que se estableció la hipótesis y el desarrollo del presente trabajo de investigación. Nosotros propusimos que **la interacción de la proteína LasR de la respuesta Quorum Sensing con la caja *las* del gen *lasB* se ve modificada por la presencia de ambos autoinductores.**

Para verificar la validez de nuestra hipótesis, planteamos el siguiente Objetivo:

Determinar si la interacción de los autoinductores N-(3-oxododecanoil) Homoserina Lactona (3O-C12-HSL) y N-Butiril Homoserina Lactona (C4-HSL) con la proteína LasR, modifican su interacción con la caja *las* del gen *lasB* de *Pseudomonas aeruginosa*

Para lograr el objetivo se planteó la siguiente estrategia experimental:

- Determinar mediante una fusión transcripcional $\phi(OP1lasB-lacZ)$ en plásmido los niveles de activación transcripcional por el complejo LasR/3O-C12-HSL y por LasR/3O-C12-HSL/C4-HSL en la cepa silvestre y en las mutantes en PAO1 $\Delta rhIR$ y en la doble mutante PAO1 $\Delta rhIR\Delta rhII$ de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar mediante una fusión transcripcional $\phi(OP1lasB-lacZ)$ en el plásmido en el fondo genético de *E. coli*, los niveles de activación transcripcional por la proteína LasR en presencia de ambos autoinductores: N-(3-oxododecanoil)-homoserina lactona (3O-C12-HSL) y N-butiril-homoserina lactona (C4-HSL).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas y su conservación.

1.1. Cepas bacterianas empleadas.

Las cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo de investigación se enlistan en la Tabla MM1, la mayoría de ellas pertenecen a la colección del grupo de investigación de Genética molecular de la producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México; algunas otras cepas fueron cedidas por otros grupos de investigación.

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Características.	Referencia.
PAO1	Tipo silvestre.	(Stover <i>et al.</i> , 2000)
PAO1 Δ <i>rhIR</i>	Derivada de PAO1, Δ <i>rhIR</i> ::Gm ^R .	(Rahim <i>et al.</i> , 2001)
PAO1 Δ <i>rhII</i> Δ <i>pqsA</i> <i>lecA</i> :: <i>lux</i>	PAO1 <i>lecA</i> :: <i>lux</i> con cassette de Tc insertado en el sitio único de <i>rhII</i> .	(Diggle <i>et al.</i> , 2007)
<i>Escherichia coli</i> .	Características.	Referencia.
DH5 α	<i>fhuA2</i> ⁻ Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169, <i>phoA glnV44</i> ϕ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1</i> <i>endA1 thi-1 hsdR17</i>	(Hanahan 1983)
BW25113	Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), <i>lambda</i> ⁻ , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR5</i>	(Datsenko <i>et al.</i> , 2000)
<i>Escherichia coli</i>	Características.	Referencia.
DH5 α	<i>fhuA2</i> ⁻ Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169, <i>phoA glnV44</i> ϕ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1</i> <i>endA1 thi-1 hsdR17</i>	(Hanahan 1983)
BW25113	Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB</i> -3), <i>lambda</i> ⁻ , <i>rph-1</i> , Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR5</i>	(Datsenko <i>et al.</i> , 2000)

<i>Serratia liquefaciens</i>	Características.	Referencia.
MG1	Cepa silvestre.	(Eberl <i>et al.</i> , 1996)
MG44	Derivada de MG1, $\Delta swrI::Sm^R$.	(Eberl <i>et al.</i> , 1996)

Tabla MM1. Cepa bacterianas usadas en el presente estudio. Se utilizaron básicamente dos cepas de *Escheriquia coli*: DH5 α y BW25113 además de *Serratia liquefaciens* MG1 y de *P. aeruginosa* la cepa silvestre y las mutantes PAO1 $\Delta rhIR$ y PAO1 $lecA::lux\Delta pqsA \Delta rhII$.

1.2. Conservación de las estirpes bacterianas.

Para conservarlas a corto plazo, un mes aproximadamente, las cepas estriadas en placa en medio LB suplementadas con el antibiótico correspondiente según el caso se mantuvieron a 4°C. Para conservarlas a largo plazo, periodos mayores a un mes, se congelaron a -80°C en glicerol al 40% (p/v).

2. Plásmidos.

Los plásmidos utilizados en este estudio se enlistan en la Tabla MM2 con sus características más importantes.

PLÁSMIDOS	Características.	Referencia.
pMP220	Tc ^R , IncP, porta el gen <i>lacZ</i> sin el promotor y posee amplio espectro de huésped.	(Spaink <i>et al.</i> , 1987)
pMT1	Amp ^R , <i>rhIR</i> bajo el promotor lac.	(Medina <i>et al.</i> , 2003)
pGMYC	Amp ^R , <i>rhIR</i> bajo el promotor lac.	(Medina <i>et al.</i> , 2003)
pMAR08	Tc ^R , porta al gen <i>lacZ</i> bajo el OP1 del promotor del gen <i>lasB</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Este estudio.
pECP64	Amp ^R , porta el gen <i>lasR</i> bajo el promotor tac y el gen <i>lacZ</i> bajo el promotor del gen <i>lasB</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (OP1 y OP2).	(Pearson <i>et al.</i> , 1997)

Tabla MM2. Plámidos usados en el presente estudio. Se utilizaron los plásmidos pMP220, pMT1, pGMYC, pECP64 y se construyó el pMAR08.

pMP220. Este vector de 10.5 kb fue construido a partir del pTJS75 (Schimdhauer & Helinsky, 1985), pertenece al grupo de incompatibilidad IncP, contiene al gen *lacZ'* de *E. coli* precedido de un SMC proveniente de pIC20H, (Marsh *et al.*, 1984), es decir, se encuentra desprovisto de promotor. Además posee el sitio de unión a ribosoma del gen *cat* (que codifica para la enzima cloramfenicol acetiltransferasa) y confiere resistencia a tetraciclina. Las características de este vector lo hacen ideal para realizar fusiones transcripcionales clonando los promotores de estudio en el SMC y permitiendo realizar estudios de expresión de los promotores a través de la medición de la actividad de la β -galactosidasa, Figura MM1.

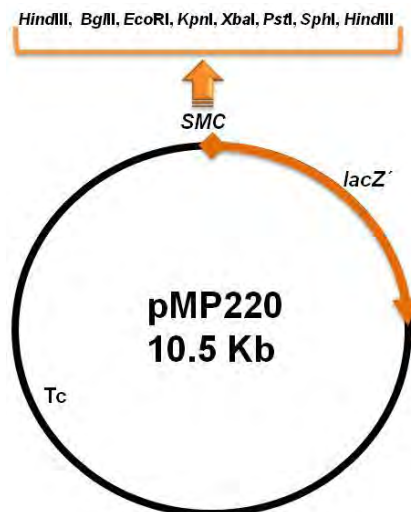


Figura MM1. Vector pMP220. Este plásmido posee el SMC de pIC20H fusionado con el gen *lacZ'*, confiere resistencia a tetraciclina y está desprovisto de promotor lo que lo hace ideal para realizar fusiones transcripcionales.

pMT1. Este vector se construyó a partir del pUCP20 (West *et al.*, 1994) que confiere resistencia a ampicilina y contiene a LasR bajo el promotor *lac* (Medina *et al.*, 2003a).

pGMYC. Este vector se construyó a partir del pUCP20 (West *et al.*, 1994) que confiere resistencia a ampicilina y contiene a RhIR bajo el promotor *lac* (Medina *et al.*, 2003b).

pECP64. Este vector se construyó a partir del pECP59 que contiene a *lasR* bajo el promotor *tac*, confiere resistencia a ampicilina, posee el gen *lacI* y se fusionó el gen *lacZ'* precedido por el promotor del gen *lasB*, tanto OP1 como OP2, de *Pseudomonas aeruginosa* (Pearson *et al.*, 1997), Figura MM2.

pMAR08. Este vector se construyó en este estudio a partir del pMP220 (Spaink *et al.*, 1987) que confiere resistencia a tetraciclina, posee el gen *lacZ'* de *E. coli*. En el SMC se fusionó parte del promotor de *lasB* que incluye sólo el OP1 de *Pseudomonas aeruginosa* quedando el gen *lacZ'* bajo el promotor del gen *lasB*, Figura MM2.

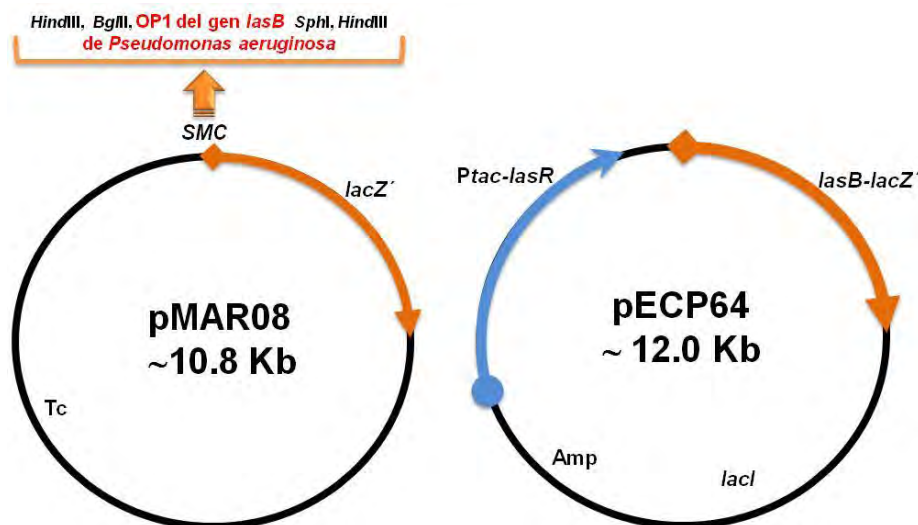


Figura MM2. Vectores pMAR08 y pECP64. El plásmido pMAR08 es una fusión transcripcional construida en el laboratorio que posee el OP1 del gen *lasB* de *Pseudomonas aeruginosa* y confiere resistencia a tetraciclina, mientras que el plásmido pECP64 es una fusión transcripcional que posee ambos operadores del gen *lasB* de *Pseudomonas aeruginosa* y a *lasR* bajo el promotor *tac*, confiere resistencia a ampicilina.

3. Condiciones y medios de cultivo.

Los medios de cultivo y soluciones utilizadas en este estudio fueron esterilizadas por medio de autoclave o por filtración según fuera el caso. Para los medios de cultivo se usó autoclave y se esterilizaron a 121°C de temperatura y una atmósfera de presión por 15 a 25 minutos, de acuerdo al medio. Para las soluciones esterilizadas por filtración se utilizaron filtros estériles de nitrocelulosa o de policarbonato de 22 µm de diámetro de poro.

La composición de cada medio de cultivo o solución utilizada se detalla a continuación.

3.1. Medios de cultivo.

Medio Luria-Bertani (LB). Este medio de cultivo fue el más comúnmente usado, tanto líquido como sólido. Para ambos se componen de 10.0 g de NaCl, 10.0 g de Bactotripton, 5.0 g de extracto de levadura aforando a 1.0 litro con agua desionizada. Para LB sólido, se adiciona 15.0 g de Bacto-agar por litro. Se esterilizó por medio de autoclave durante 25 minutos (Sambrook *et al.*, 1989).

Medio PPGAS. Este medio se utilizó para cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* y maximizar la producción de autoinductores, pirocianina y ramnolípidos. Se compone de 1.068 g de NH₄Cl, 1.462 g de KCl, 18.912 g de TRIS-HCl, 10.0 g de Peptona, se afora a 973.4 ml y se esteriliza en autoclave durante 25 minutos. Ya estéril el medio de cultivo, se adicionan 1.6 ml de Sulfato de Magnesio 1.0 M por litro (concentración final de 1.6⁻³ M) y 25.0 ml de glucosa al 20%.

Medio PY. Este medio se utilizó sólido en caja adicionado con 1% de leche descremada (DIFCO) para realizar las pruebas de proteasas totales. Se compone de 5.0 g de Peptona, 3.0 g de Extracto de levadura y 15.0 g de Bacto-agar aforando a 900 ml con agua desionizada. Además se disuelven en 100 ml de agua desionizada 10.0 g de leche (DIFCO) y ambos se esterilizan por medio de autoclave durante 15 minutos únicamente. Ya esterilizados se mezclan, la concentración final de la leche debe ser de 1% y se preparan las cajas.

Medio Mínimo AB. (Clark and Maaloe, 1967). Este medio se utilizó para realizar las pruebas de motilidad tipo “swarming” con la adición de N-Butiril-Homoserina Lactona (C4-HSL), glucosa y casaminoácidos a una concentración final de 0.05%, su preparación se realiza en dos partes: 5xA y 1xB.

La preparación del medio 5xA requiere de la adición de:

- 2.0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 6.0 g de Na_2HPO_4
- 3.0 g de KH_2PO_4
- 3.0 g de NaCl
- Se afora con agua desionizada a 200 ml. Se esteriliza mediante autoclave por 25 minutos. Además de esterilizan 797 ml de agua desionizada adicionada con 11.96 g de Bacto-agar.

Para la preparación del medio 1xA se requiere haber preparado y esterilizado por medio de filtrado:

- CaCl_2 , 0.1 M
- MgCl_2 , 1.0 M
- FeCl_3 , 0.003 M.

Ya preparado lo anterior, se mezclan:

- El agua desionizada estéril
- 1.0 ml de CaCl_2
- 1.0 ml de MgCl_2
- 1.0 ml de FeCl_3

Esta mezcla se adiciona al medio 5xA. Nunca deben adicionarse las sales al medio 5xA para evitar la precipitación de las mismas.

En el caso de las pruebas de motilidad tipo swarming se adicionaba al medio mínimo AB casaminoácidos y glucosa para una concentración final de 0.05% para

ambas y el o los autoinductores previamente extraídos o los sobrenadantes estériles por medio de filtrado.

3.2. Aminoácidos.

Se prepararon casaminoácidos en una concentración de 20 mg/ml y se esterilizaron por filtración.

3.3. Antibióticos.

La preparación de antibióticos se realizó con agua desionizada (H_2O_d) y filtrada por medio de filtros estériles. El ácido nalidíxico y tetraciclina se disolvieron en metanol, mientras que gentamicina y ampicilina en agua. La concentración del stock de tetraciclina se preparó a 24 mg/ml, el de ácido nalidíxico a 20 mg/ml, gentamicina y ampicilina a 50 mg/ml.

3.4. Condiciones de cultivo.

Las condiciones de cultivo para *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron de 37°C mientras que las de *Serratia liquefaciens* fueron de 30°C. En todos los casos se incubaron a 225 rpm.

4. Transferencia de plásmidos.

Existen diversas técnicas para introducir DNA extraño dentro de las células, sin embargo éstas deben ser tratadas previamente para admitir dicho DNA que pueden ser fragmentos o plásmidos. A las células que reciben este tratamiento previo se les denomina “competentes”.

4.1. Preparación de células competentes.

Existen varias técnicas para la preparación de células competentes. En este estudio se llevaron a cabo dos, una de ellas para la preparación de competentes de *E. coli* y otra para *P. aeruginosa*.

Para *E. coli*:

- ❖ Se descongeló un criovial de *E. coli* BW25113 mantenido a -80°C lentamente, ya descongeladas se inocularon 500 ml de medio LB sin antibiótico. se incubaron a 37°C hasta llegar a una OD a 600 nm de 0.3 a 0.4. Se incuban en hielo y se centrifugan en un rotor Sorvall GSA a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C . En este momento se colocan CaCl_2 y MgCl_2 (100mM cada uno) en hielo.
- ❖ Se resuspendió lentamente el pellet celular en $\frac{1}{4}$ del volumen inicial (125 ml) de MgCl_2 , 100mM frío (tomando de 3 a 5 minutos en el procedimiento). Posteriormente se centrifuga a 4,000 rpm durante 10 minutos a 4°C .
- ❖ Nuevamente se resuspendió lentamente el pellet celular en $\frac{1}{20}$ del volumen inicial (25 ml) de CaCl_2 100mM adicionando después $\frac{9}{20}$ de CaCl_2 . Se incubó durante 30 minutos en hielo.
- ❖ Se centrifuga a 4,000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se resuspende lentamente el pellet en $\frac{1}{50}$ partes del volumen inicial (10 ml) de CaCl_2 85 mM y glicerol al 15% (p/v).
- ❖ Finalmente se alicuotan 100 μL de células competentes en tubos eppendorf estériles y se congelan a -80°C o se utilizan inmediatamente.

Para *P. aeruginosa*:

- ❖ Se inoculan 500 ml de medio LB con 5 ml de un cultivo incubado overnight (14 horas) en medio LB a 37°C . Éstas se incuban a 37°C a 225 rpm hasta alcanzar una OD a 600 nm de entre 0.5 a 0.6.
- ❖ Inmediatamente se colocan en hielo durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugan en un rotor Sorvall a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C .
- ❖ Las células se lavan dos veces con 250 ml de MgCl_2 , 150mM frío (0.5 del volumen inicial). Las células se centrifugan cada vez a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C . después de la primera centrifugación, las células se lavan con 250 ml de MgCl_2 , 150mM frío y se incuban en hielo por 1 hora. Se centrifugan como se indicó arriba.

- ❖ El pellet se resuspende en 20 ml de $MgCl_2$, 150mM conteniendo 15% de glicerol (p/v).
- ❖ Se alicuotan 100 μL de células competentes en tubos eppendorf estériles y se congelan a $-80^\circ C$ cuando menos de 12 a 24 horas para aumentar la eficiencia en el proceso de transformación.

4.2. Transferencia por choque térmico.

Se realizaron dos métodos diferentes para transformar células competentes, uno para *E. coli* y otro para *P. aeruginosa*:

Para *E. coli*:

- ❖ Se descongelaron lentamente las células competentes a transformar.
- ❖ Se alicuotaron 50 μL de células competentes en tubos eppendorf estériles y se adicionaron entre 1 y 10 μL de DNA con el que se iba a transformar. Como control se adicionó únicamente el buffer en el cual fue resuspendido el DNA.
- ❖ La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos e inmediatamente se dió un choque de calor a $42^\circ C$ durante 2 minutos.
- ❖ Inmediatamente se pasó a hielo y se incubó por 5 minutos.
- ❖ Posteriormente se adicionaron 500 μL de medio LB y se incubó a $37^\circ C$ por una hora a 300 rpm. Cuando se transformaron plasmidos que conferían resistencia a Tetraciclina se incubó por dos horas.
- ❖ Se tomaron 200 μL y se platearon en cajas de medio LB adicionadas con el antibiótico correspondiente.
- ❖ Como control, las células competentes a las que no se le adicionó DNA se platean en cajas con y sin medio suplementado.

Para *P. aeruginosa*:

- ❖ Se descongelaron lentamente las células competentes a transformar.
- ❖ A 200 μL de células competentes se adicionaron entre 1 y 10 μL de DNA (aproximadamente 1 μg) y se incubaron en hielo por una hora.

- ❖ Se dio choque térmico a 50°C por 3 minutos. Posteriormente se añadió 500 µL de medio LB atemperado a 37°C y se incubó a 37°C por dos horas con agitación suave.
- ❖ Se tomaron 200 µL y se platearon en cajas de medio LB adicionadas con el antibiótico correspondiente.
- ❖ Como control, las células competentes a las que no se le adicionó DNA se platean en cajas con y sin antibiótico suplementado.

5. Aislamiento de DNA.

5.1. Aislamiento de DNA plasmídico.

La cepa bacteriana donadora de plásmido se cultivó en medio LB suplementado con el antibiótico de interés durante 12-14 horas con agitación a 37°C. La extracción de plásmido se realizó mediante la técnica de lisis alcalina (Sambrook and Maniatis, 1989) que describiré a continuación, o mediante la utilización del kit QIAGEN.

Para la lisis alcalina se requieren cuatro soluciones (stock):

❖ Solución GTE:

Glucosa estéril al 40%.	2.27 ml
EDTA 0.5 M, pH 8.0	2.00 ml
Tris-HCl 1.0 M, pH 8	2.50 ml
Agua desionizada estéril	93.23 ml
Total	100.00 ml

❖ Solución de lisis:

NaOH 1.0 N	2.00 ml
SDS 10%	1.00 ml
Agua desionizada estéril	7.00 ml
Total	10.00 ml

❖ Acetato de potasio 3.0 M

KOAc 5.0 M	60.00 ml
Ácido acético glacial	11.50 ml
Agua desionizada	28.50 ml
Total	100.00 ml

❖ RNAsa (10.0 mg/ml)

Se disolvieron 100 mg de RNAsa A (RNAsa pancreática) en 10.0 ml de Tris-HCl 15mM NaCl 15mM. Se calentaron a 100°C por 15 minutos y posteriormente se enfrió a temperatura ambiente. Se alicuotaron en tubos eppendor y congelaron a -20°C.

Procedimiento:

- Se inocularon 20 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, con la cepa bacteriana donadora de plásmido y se incubó por 12 horas a 37°C y 225 rpm de agitación.
- Se obtuvo el pellet celular por centrifugación a 2,500 rpm durante 15 minutos.
- El pellet obtenido se resuspendió en 800 µL de solución GTE, se adicionó lisozima a una concentración final de 300 µg/ml y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Se añadieron 12 µL de RNAsa y se incubó en hielo por 30 minutos.
- Se adicionaron 300 µL de acetato de potasio 3.0 M frío mezclando suavemente. Se incubó en hielo por 5 minutos más.
- Se centrifugó durante 15 minutos a 5,000 rpm a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio.
- Al sobrenadante obtenido se adicionan 0.6 del volumen inicial (1.2 ml) de isopropanol y se mezcla suavemente. Se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Se centrifugó a 5,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- El pellet obtenido se lava dos veces con etanol al 70% frío, en cada ocasión se centrifugó por 1 minuto y se descarta el sobrenadante.

- El pellet obtenido se seca por 10 minutos y se resuspende en 100 μ L de agua desionizada estéril. Se agrega 1.0 μ L de RNAsa y se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos.

5.2. Extracción de DNA cromosómico.

La extracción de DNA cromosómico se realizó mediante el kit QIAGEN.

6. Técnicas de manipulación de DNA.

6.1. Determinación de la concentración de DNA.

Para la determinación de la concentración de DNA posterior a la purificación o extracción se utilizó un Nanodrop ND-1000 spectrophotometer.

6.2. Digestión de DNA con enzimas de restricción.

Las reacciones de restricción en DNA plasmídico se realizaron de acuerdo a las especificaciones de cada fabricante requiriendo todas el tampón de restricción necesario y, en algunos casos, albúmina. Se tomó en cuenta que una unidad de enzima de restricción digiere 1.0 mg de DNA en un volumen de reacción de 50 μ L durante una hora, sin embargo en algunos casos como la digestión del plásmido pMP220 fue necesario utilizar dos veces la cantidad indicada de la enzima de restricción e incubar por dos o tres veces más del tiempo indicado. Posteriormente la reacción de restricción se detuvo por frío o calor según fuera el caso. Se verificó cada una de las reacciones de restricción corriendo un gel de agarosa al 1%.

6.3. Electroforesis de DNA.

La electroforesis de DNA se realizó de acuerdo a Sambrook y colaboradores (1989), los geles de agarosa se prepararon con tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA) y su concentración varió entre el 1 y 2% dependiendo del tamaño de DNA que deseaba observarse. La separación se realizó de manera horizontal sumergida en un voltaje de 100 V.

El gel se tiñó por inmersión en bromuro de etidio y se observó mediante luz ultravioleta (245 nm).

El tampón TAE (50x) se preparó con 242.0 g de Tris base, 37.2 g de EDTA disódico dihidratado, 57.1 ml de ácido acético glacial y aforando hasta 1.0 litro con agua miliQ. Se esteriliza mediante autoclave por 25 minutos. Para la preparación de geles y la electroforación se diluyó el tampón TAE a 1x.

6.4. Recuperación de fragmentos de DNA.

La recuperación de los fragmentos de DNA deseados a partir de geles de agarosa se realizó con kit de Promega.

6.5. Secuenciación de DNA.

La secuenciación de DNA se realizó de manera automatizada en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

6.6. Reacción de amplificación en cadena (PCR).

Esta técnica se utilizó para amplificar un fragmento de DNA de interés y posteriormente clonarlo en un plásmido. La reacción se realizó con 1.0 µg de DNA templado, nucleótidos 10.0 mM cada uno, solución de MgCl₂, agua libre de nucleasas, Flexi buffer 5x green (Go Taq®, Promega), GoTaq DNA polimerasa® (Promega).

5X Green GoTaq FlexiBuffer®	5.0 µL
Solución de MgCl ₂	2.0 µL
Oligonucleótido Forward (10mM)	1.0 µL
Oligonucleótido Reverse (10mM)	1.0 µL
dNTPs	1.0
DNA polimerasa GoTag®	0.25 µL (1.25 u)
DNA templado (<i>P. aeruginosa</i>)	0.5 µL (~1.0 µg)
Agua libre de nucleasas	hasta 25.0 µL

La amplificación se realizó en un termociclador con el cual debieron estandarizarse las condiciones para obtener una óptima amplificación del OP1 del gen *lasB* de *Pseudomonas aeruginosa*. Para ello se realizó la reacción en gradiente térmica desde 50 hasta 65°C (de acuerdo a la T_m de los oligonucleótidos sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM). De acuerdo a las reacciones de estandarización, las condiciones óptimas para la amplificación son:

Desnaturalización inicial	95°C	5.0 minutos
Desnaturalización	95°C	1.0 minuto
Alineación	52°C	1.0 minuto
Extensión	72°C	1.0 minuto
Extensión final	72°C	10.0 minutos
Conservación	4°C	15.0 minutos

Se verificó la amplificación del fragmento de DNA deseado mediante electroforesis con gel de agarosa al 2% debido a que el tamaño del fragmento era de aproximadamente 300 pb. Se purificó la reacción de amplificación con kit de Promega.

7. Transducción.

La transducción es una técnica que se empleó para la generación de mutantes de *P. aeruginosa* a partir de otras cepas mutadas. Mediante este proceso se transfieren genes modificados o mutados (sea por delección, inserción o ambos) a otra bacteria a través de un bacteriófago. Los genes a transducir se encapsulan en el interior de la cápside de un fago (transducción generalizada), cuando éste infecta a otra bacteria el material genético es transferido a éste y puede recombinar con el DNA cromosomal de la bacteria receptora generando genes deficientes.

Para la transducción se utilizó el fago E79tv-2 (Holloway *et al.*, 1960, Holloway and Krishnapillai, 1975) y la técnica propuesta por Budzik *et al.*, (2004):

Día 1.

- Se inocularon 5.0 ml de medio LB con la cepa donadora y se incubó a 37°C a 225 rpm durante 12-14 horas.

Día 2.

- Se combinaron 100 µL del fago E79tv-2, ($\sim 1 \times 10^9$ unidades formadoras de placa, PFU) con 100 µL de la bacteria donadora ($\sim 5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonia, CFU) y CaCl₂ hasta una concentración final de 10mM.
- Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y la mezcla se combinó con 3.0 ml de LB con agar al 0.8% (top agar) y se vació sobre cajas de LB preparadas previamente.
- Se incubaron las cajas 16 horas a 37°C.

Día 3.

- Se adicionaron 4.0 ml de LB líquido sobre el top agar que contenían las bacterias y fagos y se recogió todo el top agar colocándolo en un tubo de vidrio.
- Se adicionaron 3.0 ml más de LB líquido y se agitó suavemente durante 4 horas a temperatura ambiente para liberar el fago del top agar.
- Se centrifugó a 4,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para remover bacterias y agar. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo limpio. Para lisar las células residuales se agregaron 6 gotas de cloroformo y se vortexeó y almacenó a 4°C. El título del fago quedó entre 10^{10} y 10^{11} PFU/ml.
- Se inocularon 5.0 ml de medio LB con la cepa receptora y se incubó a 37°C a 225 rpm durante 12-14 horas.

Día 4.**Transducción de la mutación.**

- Se mezclaron 100 μL del fago obtenido el día anterior (10^{10} y 10^{11} PFU/ml) con 100 μL del cultivo de la cepa receptora ($\sim 5 \times 10^8$ CFU) y CaCl_2 hasta una concentración final de 10mM.
- Se repitió el paso anterior pero con 50, 20, 10 y 5 μL de la bacteria receptora.
- Se incubó por 15 minutos a 37°C y se plateó en cajas de LB suplementadas con el antibiótico correspondiente a la mutación a transferir.
- Las transductantes aparecen después de 48 horas de incubación a 37°C .

8. Extracción de autoinductores.

Para la extracción de autoinductores se inocularon 5 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente con las cepas de interés y se incubaron a 37°C con agitación de 225 rpm durante 12-14 horas. Con este cultivo se inocularon 25 ml de medio PPGAS incubando a 37°C por 18 horas con agitación de 225 rpm. Transcurridas las 18 horas, se centrifugó el cultivo para extraer el sobrenadante al que se le adicionó un volumen igual de acetato de etilo acidificado (por cada 1.0 litro de acetato de etilo se agrega 0.1 ml de ácido acético). Se vortexea hasta mezclar uniformemente y se centrifuga por 1.0 minuto para separar ambas fases. Se tomó la fase acuosa (orgánica) y se colocó en un tubo limpio. La extracción se repite nuevamente juntando ambas fases acuosas extraídas. Se evapora el acetato de etilo en campana o en rotavapor. El residuo resultante se resuspende en 0.1 volúmenes (250 μL) de metanol grado HPL o acetato de etilo.

9. Determinación de la producción de N-butanoil-homoserina lactona (C4-HSL).

Para la determinación de la producción de C4-HSL se utilizó la cepa bacteriana *Serratia liquefaciens*, la cual requiere del autoinductor C4-HSL para controlar el comportamiento y diferenciación celular y expresar la motilidad tipo swarming en medio semi-sólido. La motilidad tipo swarming es un comportamiento coordinado e implica diferenciación celular y está regulado por Quorum Sensing pues involucra una molécula señalizadora perteneciente al grupo de las homoserina lactonas: C4-HSL, la cual es sintetizada por la sintasa codificada por el gen *swrI*. Para estos ensayos se usó la cepa silvestre (MG1) como control y para determinar la producción de C4-HSL se utilizó la mutante *swrI* (MG44) que es deficiente en la producción de C4-HSL. Para determinar la motilidad swarming se usaron cajas de medio mínimo AB (0.7% agar), 0.5% de casaminoácidos y 10 μ M C4-HSL para la expresión de la motilidad tipo swarming (Eberl *et al.*, 1996).

Serratia liquefaciens, MG1 y MG44 se cultivaron en medio LB, para la mutante *swrI* se adicionó al medio 200 μ g/ml de estreptomicina y se incubaron a 30°C con 225 rpm de agitación durante 12 horas.

Las cajas se hicieron con medio mínimo AB-agar 0.7% suplementadas con casaminoácidos al 0.5% y/o los sobrenadantes o los autoinductores extraídos de las cepas de interés. Cada caja se inoculó con 5 μ L del cultivo de *Serratia liquefaciens* y se incubaron a 30°C por 48 horas revisando cada 6 horas.

Los reactivos empleados fueron:

- Medio Mínimo AB-bacto agar 0.7%.
- Casaminoácidos 10%
- C4-HSL
- Autoinductores extraídos o sobrenadantes de cada cepa de interés esterilizados por filtración.

10. Cuantificación de Ramnolípidos.

Para cuantificar los ramnolípidos producidos por una cepa se utilizó el método del orcinol (Chandrasekaran and Bemiller, 1980). Para la extracción de ramnolípidos se inocularon 5 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente con las cepas de interés y se incubaron a 37°C con agitación de 225 rpm durante 12-14 horas. Con este cultivo se inocularon 10 ml de medio PPGAS incubando a 37°C por 18 horas con agitación de 225 rpm. Se centrifugaron 2 ml de cultivo por 5 minutos a 10,000 rpm a temperatura ambiente para obtener el sobrenadante. De éste se tomaron 333 μ L y se añadió 1 ml de éter vortexeando vigorosamente y centrifugando por 1 minuto para separar las fases. Se extrajo el éter (fase superior) y se colocó en un tubo limpio. Esta extracción se repite nuevamente y se juntan ambas fases extraídas y se evapora en campana. El residuo obtenido se resuspende en 1ml de agua destilada.

Para la determinación de la ramnosa se preparó una solución de Orcinol al 1.6% en H₂O (0.6 ml por cada 5.0 ml de solución necesaria) y H₂SO₄ al 60% (4.4 ml por cada 5.0 ml de solución requerida). Se mezclan cuidadosamente 900 μ L del reactivo de orcinol más 100 μ L de la extracción de ramnolípidos. Se incubó por 30 minutos a 80°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente por 15 minutos. Se realizó lectura en el espectrofotómetro a A₄₂₁.

11. Cuantificación de Piocianina.

Para la extracción de piocianina (Essar *et al.*, 1990) se inocularon 5 ml de medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente con las cepas de interés y se incubaron a 37°C con agitación de 225 rpm durante 12-14 horas. Con este cultivo se inocularon 15 ml de medio PPGAS incubando a 37°C por 18 horas con agitación de 225 rpm. El cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente para obtener el sobrenadante del cual se tomó una muestra de 5.0 ml, se adicionaron 5.0 ml de cloroformo y se mezcló durante 1 minuto. Se centrifugó nuevamente durante 1 minuto para separar ambas fases

separando la orgánica y colocándola en un tubo limpio. A la fase orgánica extraída se le adicionaron 1.5 ml de HCl 0.2N y se mezcló por 1 minuto. Se dejó el tubo a temperatura ambiente para separar ambas fases y se extrajo el HCl. La cantidad de piocianina se determinó midiendo en el espectrofotómetro a A_{520} . La medición obtenida se multiplicó por 17.072 para determinar la cantidad de piocianina por muestra ($\mu\text{g/ml}$).

12. Medición de la actividad elastolítica.

La determinación de la actividad elastolítica se realizó de acuerdo al método propuesto por Beatson *et al.*, (2002). Se inoculó medio LB con las cepas de interés y se incubaron a 37°C por 16 horas. Se centrifugó el cultivo para obtener el sobrenadante. De 500 μL de sobrenadante se realizó dilución 1:10 con medio LB y se agregaron 10 mg de Elastina Rojo Congo (Sigma) y se incubaron en tubos de vidrio a 37°C por 16 horas. Se centrifugó nuevamente para obtener el sobrenadante el cual se diluyó 1:10 y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a A_{495} . El blanco utilizado fueron 500 μL de medio LB al que se le adicionaron 10 mg de Elastina Rojo Congo y recibió el mismo tratamiento que el resto de las muestras. La actividad elastolítica relativa de cada cepa se representó por la absorbancia registrada a 495 nm y ajustada por la dilución.

13. Medición de la β -galactosidasa.

La medición de la actividad de la β -galactosidasa se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Miller y colaboradores (1992). Esta técnica se basa en una reacción colorimétrica que puede ser cuantificada en un espectrofotómetro. El sustrato de la reacción es el O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) el cual es hidrolizado por la enzima β -galactosidasa (codificado por el gen *lacZ*). Los productos de la reacción son el O-nitrofenol que da una coloración amarilla y la galactosa, la coloración amarilla permite la cuantificación a través de la medición

de la absorbancia en espectrofotómetro a A_{420} y A_{550} ; esta última medición permite realizar una corrección debido a la turbidez celular. Se inocularon 20 ml de medio LB incubándose a 37°C con 225 rpm de agitación. Se tomó 1.0 ml de cultivo y se centrifugó durante 3 minutos a 10,000 rpm tirando el sobrenadante y resuspendiendo en buffer Z, en este momento se midió OD a 600 nm. Nuevamente se centrifugó descartando el sobrenadante.

Antes de realizar la técnica se prepararon: buffer Z mezclado con SDS en una concentración final de 0.1% y β -mercaptoetanol en una concentración final de 0.05%. El pellet obtenido de cada muestra se resuspendió en buffer Z/ β -mercaptoetanol.

En tubos eppendorf de 1.5 ml se agregaron 800 μ L de Buffer Z/ β -mercaptoetanol/SDS/, 10 μ L de cloroformo y 200 μ L de células. Se vortexeó durante 5 segundos y se incubó durante 10 minutos. Pasado el tiempo se agregaron 200 μ L de ONPG (4 mg/ml) y se agitó con vortex brevemente. Cada muestra se incubó durante el tiempo necesario hasta que el color amarillo sea claramente visible. La reacción se detuvo adicionando 500 μ L de Na_2CO_3 . Todas las reacciones se realizaron a una temperatura de 28°C y cada muestra se trató de la misma manera para evitar variaciones. La concentración de O-nitrofenol se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 420. Para realizar la corrección debido a la turbidez celular también se realizó medición de absorbancia a 550 nm.

El cálculo de la actividad de la β -galactosidasa (cantidad de ONPG hidrolizado por minuto como función de la densidad celular) se realiza utilizando la ecuación de Miller:

$$UNIDADES MILLER = \frac{1000(OD_{420nm} - 1.75(OD_{550nm}))}{(t)(v)(OD_{600nm})}$$

Donde:

t=Tiempo de la reacción (minutos).

v =volumen de la suspensión celular (ml).

Reactivos empleados:

- Buffer Z

Na_2HPO_4 8.5176 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5.5200 g

KCl 0.7455 g

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.0 M) 1.000 ml

- Na_2CO_3 , 1.0 M
- Cloroformo

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Efecto de C4-HSL sobre la activación dependiente de LasR::3O-C12-HSL en la expresión de la fusión pMP220 ϕ (OP1*lasB*::*lacZ*) en *E. coli*.

1.1. Curvas de crecimiento y expresión de la actividad de β -galactosidasa.

Se decidió realizar una fusión transcripcional de una sección de la región 5' del gen *lasB* que contiene el OP1 de *Pseudomonas aeruginosa* al gen *lacZ'* del plásmido pMP220 obteniéndose el plásmido pMAR08 (pMP220 ϕ (OP1*lasB*::*lacZ*)) portador de un fragmento de 294 pb. Este plásmido y pMT1 (contiene *lasR* bajo el promotor *lac*) se transformaron en *E. coli* (cepa BW25113) con el objeto de determinar su expresión en presencia de la proteína reguladora LasR y los autoinductores (AIs) 3O-C12-HSL y de 3O-C12-HSL/C4-HSL a través de la actividad de la β -galactosidasa. Los ensayos para ello se realizaron en medio LB a 37°C con agitación constante de 225 rpm inducida con 0.4 mM de IPTG, sin AIs y adicionados con C4-HSL (1.0 μ M), 3O-C12-HSL (10.0 μ M) y con ambos AIs respectivamente. Se obtuvieron muestras cada hora para medir OD₆₀₀ y para cuantificar la actividad de la β -galactosidasa. La Figura R11 muestra la cinética de crecimiento de cada uno de los ensayos que no mostraron diferencias significativas.

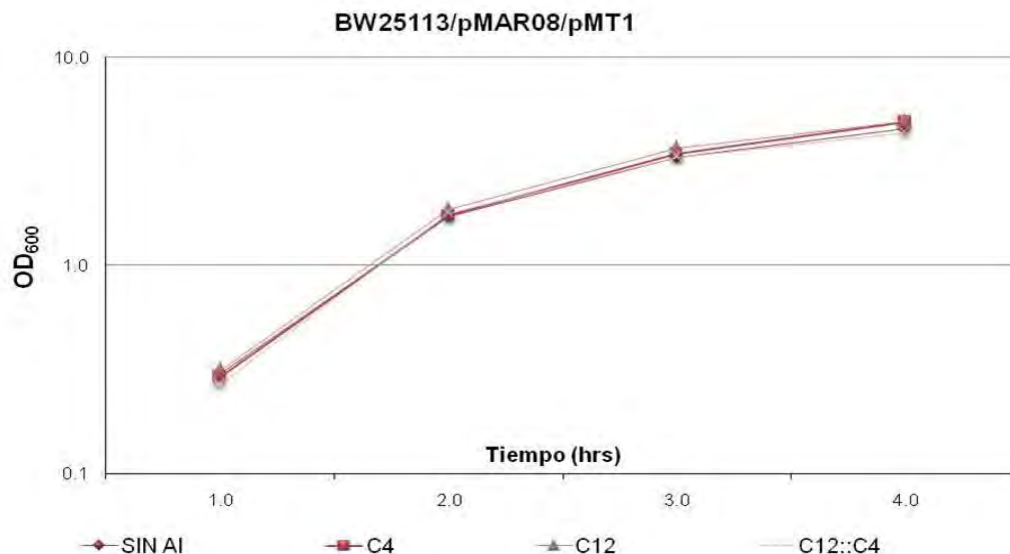


Figura R11. Curvas de crecimiento de *E. coli* BW25113 transformada con los plásmidos pMAR08 y pMT1. Sin adición de autoinductor (diamante cerrado), adicionada con 1.0 μ M C4-HSL (cuadro cerrado), 10.0 μ M 3O-C12-HSL (triángulo cerrado) y ambos (estrella). La presencia de alguno de los autoinductores o ambos no afecta la cinética de crecimiento.

1.2. Expresión de la actividad de β -galactosidasa en pMAR08 en *E. coli* BW25113.

Los resultados obtenidos de la actividad de la β -galactosidasa se muestran en la FiguraR12 e indican que los cultivos sin AIs y con 1.0 μ M de C4-HSL presentaron un nivel de expresión basal. El cultivo suplementado con 10.0 μ M de 3O-C12-HSL mostró la máxima inducción debido a la presencia de la proteína LasR y el autoinductor 3O-C12-HSL. El ensayo suplementado con ambos AIs presentó una decremento en los niveles de la inducción debida a la presencia de C4-HSL, lo cual está de acuerdo con nuestra hipótesis. Las proporciones en la disminución son mayores en los tiempos t1 y t2, conforme el cultivo llega a fase estacionaria la disminución se reduce.

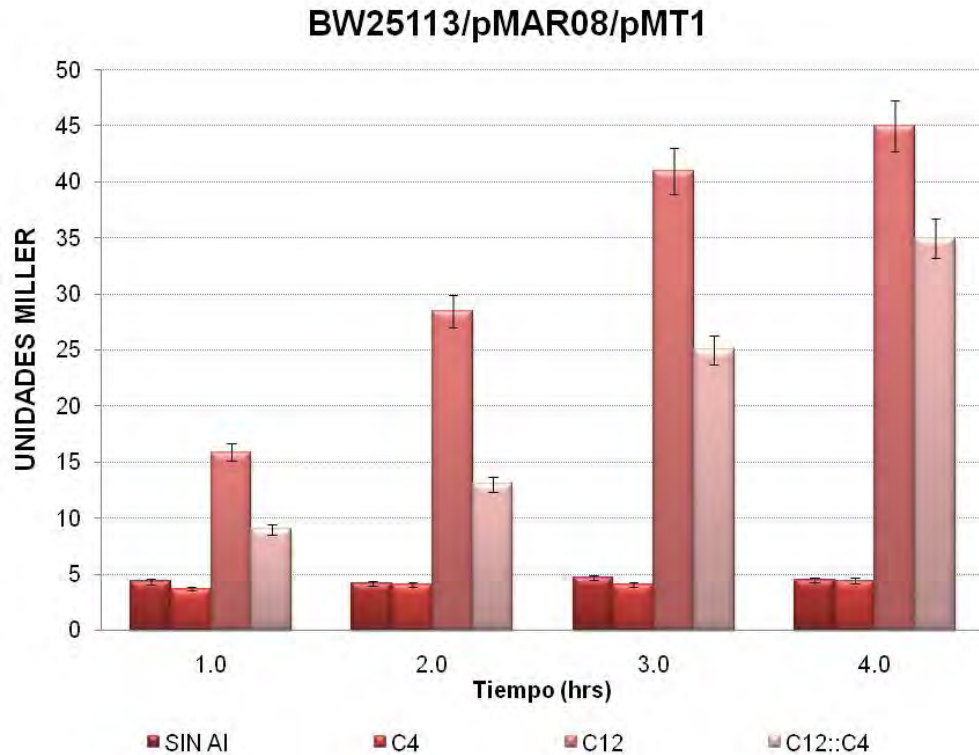


Figura R12. Ensayo de la actividad de la β -galactosidasa del plásmido pMAR08 en *E. coli* BW25113 en presencia de pMT1 (proteína reguladora LasR). La cepa fue transformada inicialmente con pMT1, los 4 ensayos se realizaron en medio LB a 37°C con agitación constante: al primero de ellos no se le adicionó AI, los siguientes fueron adicionados con C4-HSL (1.0 μ M), 3O-C12-HSL (10.0 μ M) y con C4-HSL/3O-C12-HSL respectivamente. Los dos primeros mostraron expresión basal de la β -galactosidasa, el suplementado con 3O-C12-HSL mostró la máxima inducción debido a la presencia de LasR/3O-C12-HSL. El último suplementado con ambos autoinductores mostró una disminución de la actividad de la β -galactosidasa en un 30% aproximadamente en el tiempo t4.

Este resultado indica que la presencia del autoinductor C4-HSL modifica los niveles de expresión de la fusión (pMP220 ϕ (*OP1lasB::lacZ*)) dependiente de LasR/3O-C12-HSL, lo que está de acuerdo con la hipótesis planteada.

2. Efecto de C4-HSL en la actividad dependiente de LasR/3O-C12-HSL mediante el plásmido pECP64 (*ptac:lasR ϕ lasB::lacZ*).

En el ensayo anterior se determinó que la presencia de C4-HSL modifica los niveles de expresión de la fusión (pMP220 ϕ (*OP1lasB::lacZ*)) disminuyéndolos en un 30%, sin embargo se desea saber si esta disminución puede verse

incrementada o disminuida en una fusión con ambos operadores (OP1 y OP2) del gen *lasB* de *P. aeruginosa*, por lo que se utilizó el plásmido pECP64 (Pearson *et al.*, 1997) que contiene a *lasR* bajo el promotor *tac* y la fusión *lasB::lacZ*.

2.1. Curvas de crecimiento.

Para confirmar los resultados obtenidos con el plásmido pMAR08 (fusión pMP220φ(*OP1lasB::lacZ*)) en *E. coli* BW25113 con la proteína LasR y en presencia de ambos autoinductores, se utilizó el plásmido pECP64. Este plásmido fue transformado en la cepa de *E. coli* BW25113 y cultivado en medio LB a 37°C con agitación constante de 225 rpm hasta una OD₆₀₀ cercana a 5.0 y se tomaron muestras cada hora para verificar la cinética de crecimiento y la actividad de la β-galactosidasa. La Figura R13 muestra la cinética de crecimiento sin la adición de autoinductores y adicionando C4-HSL (1.0 μM), 3O-C12-HSL (10.0 μM) ambos en las concentraciones señaladas. La adición de 3O-C12-HSL produce un crecimiento ligeramente más lento que las cepas sin Als y la suplementada con C4-HSL mientras que la suplementada con ambos Als crece de manera similar a las dos anteriores superando el retardo que presenta la suplementada únicamente con 3O-C12-HSL.

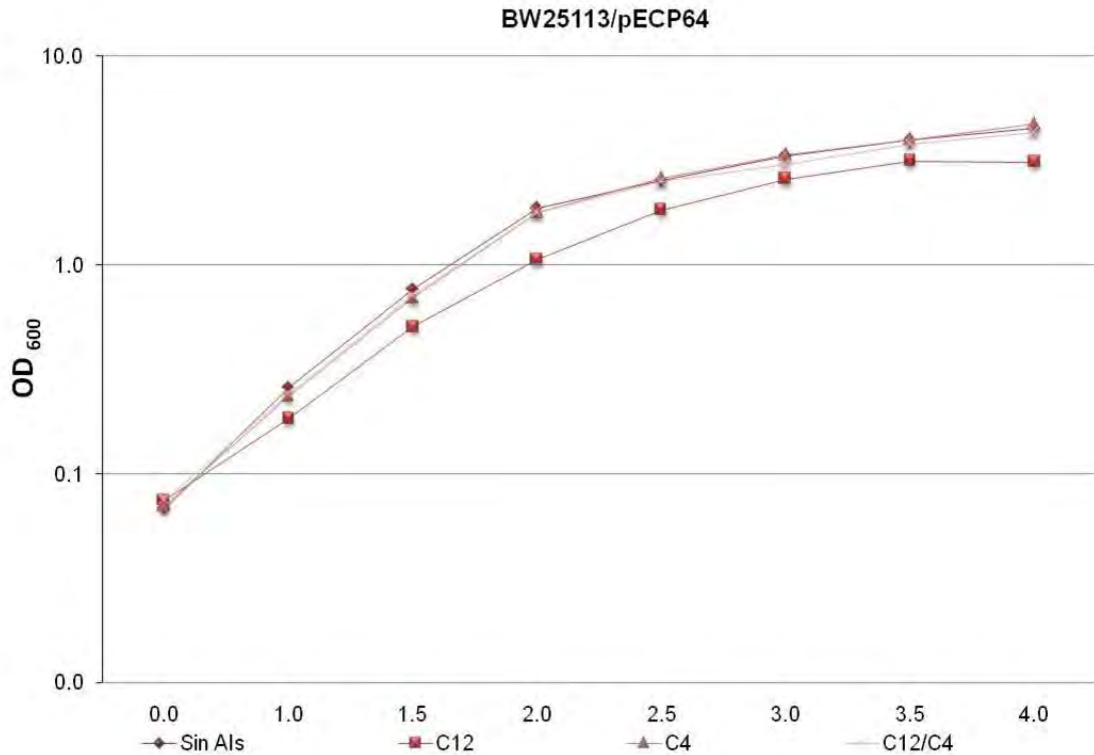


Figura R13. Curvas de crecimiento de *E. coli* BW25113 transformada con el plásmido pECP64 que contiene a *lasR* bajo el promotor *tac* y la fusión *lasB::lacZ* (se encuentran presentes ambos operadores del gen *lasB*: OP1 y OP2), sin adición de autoinductor (diamante cerrado), adicionada con 1.0 μ M C4-HSL (cuadro cerrado), 10.0 μ M 3O-C12-HSL (triángulo cerrado) y ambos (estrella). La presencia de 3O-C12-HSL produce un ligero retraso en el crecimiento que no es significativo; el ensayo suplementado con ambos Als se comporta de manera similar que los ensayos sin Als y suplementado con C4-HSL.

2.2. Expresión de la actividad de β -galactosidasa de la fusión *lasB::lacZ* codificada en el plásmido pECP64

Para determinar si se modifican los patrones de expresión de la β -galactosidasa por la presencia de C4-HSL usando el plásmido pECP64, se midió la actividad de ésta cada 30 minutos, Tabla R1. Los resultados revelaron una disminución en la inducción cuando se encuentran presentes ambos Als que corresponde aproximadamente a un 25% con respecto al ensayo al que se le adicionó 3O-C12-HSL. La ausencia de Als y la adición de C4-HSL presentan una actividad basal de la β -galactosidasa Figura R14.

Tiempo (t)	Sin Als	3O-C12-HSL (10.0 μ M)	C4-HSL (1.0 μ M)	3O-C12-HSL (10.0 μ M) C4-HSL (1.0 μ M)
UNIDADES MILLER				
1	35.035	198.62	30.98	104.67
2	35.940	244.54	37.23	151.14
3	60.710	835.63	56.29	305.91
4	137.690	1,866.67	119.57	1,358.05

Tabla R1 Expresión de la actividad de la β -galactosidasa de la fusión *lasB::lacZ* del plásmido pECP64. El ensayo adicionado con 3O-C12-HSL muestra la máxima inducción cuantificando 1,866.67 U.M., la adición de 3O-C12-HSL (10.0 μ M) y C4-HSL (1.0 μ M) disminuye los niveles de inducción aproximadamente en un 27%.

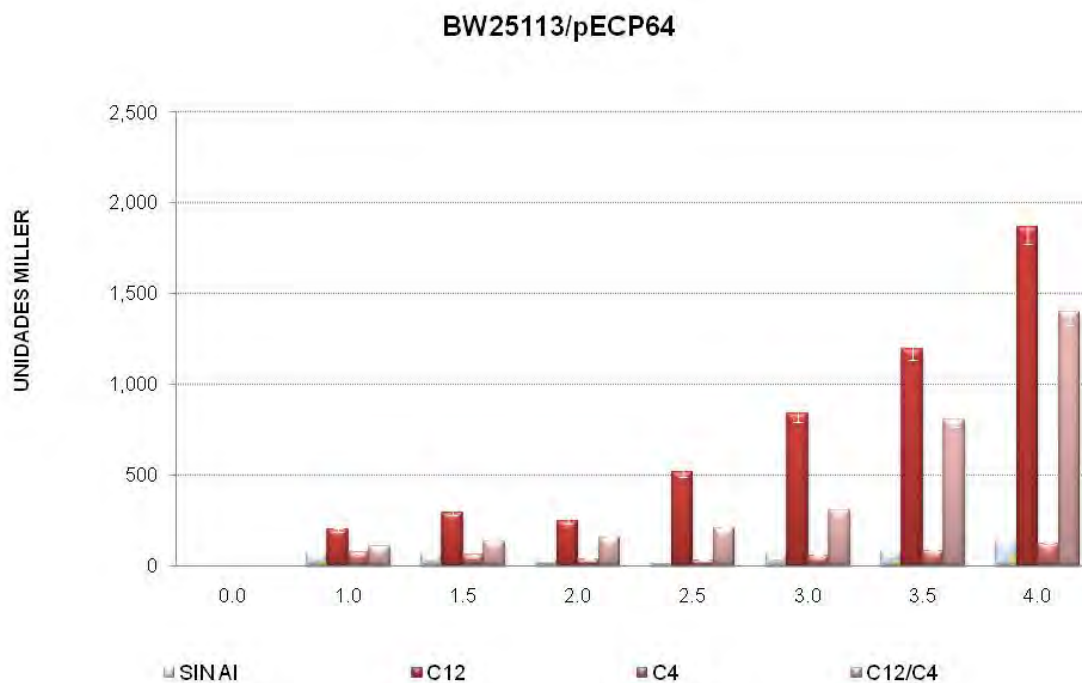


Figura R14. Patrones de expresión de la β -galactosidasa con el plásmido pECP64 cada 30 minutos en ausencia de autoinductores y cuando se adiciona C4-HSL (1.0 μ M), 3O-C12-HSL (10.0 μ M) y ambos en las mismas concentraciones anteriores. La disminución en la actividad cuando se encuentran presentes ambos autoinductores es de 25% aproximadamente para t4.

Este resultado muestra que la expresión del gen *lasB* (con OP1 y OP2) dependiente de LasR/3O-C12-HSL se ve disminuida por la presencia de C4-HSL.

3. Competencia entre C4-HSL y 3O-C12-HSL.

Los ensayos hasta ahora confirman que la presencia de ambos autoinductores modifican la actividad de la β -galactosidasa, tanto en pMAR08 que únicamente contiene al OP1 del gen *lasB* como en pECP64 que contiene ambos operadores (OP1 y OP2). En los ensayos anteriores la adición de ambos autoinductores se realizó al mismo tiempo (t_0) y en proporción 1:10 de 3O-C12-HSL y C4-HSL respectivamente (inoculación del medio LB). Los siguientes ensayos de competencia de autoinductores pretenden dar respuesta a las siguientes interrogantes:

- Si la modificación de las concentraciones de los autoinductores modifican el patrón de inducción de la β -galactosidasa observada en los experimentos anteriores, indicando que la proporción entre la concentración de los AIs es importante para la inducción de la elastasa.
- Si la adición de 3O-C12-HSL antes que el C4-HSL o viceversa modifica el patrón de actividad observado durante la inducción de la β -galactosidasa.

3.1. Presencia de diferentes concentraciones de ambos autoinductores.

Con el fin de determinar si diferentes concentraciones de 3O-C12-HSL y C4-HSL pueden modificar los niveles de activación de la β -galactosidasa cuando ambos autoinductores se encuentran presentes, se realizó un ensayo en *E. coli*, BW25113 transformada con el plásmido pECP64 en el que se adicionaron ambos autoinductores en proporciones 1 μ M:10 μ M, 10 μ M:1 μ M y 1 μ M:1 μ M. Los cultivos se incubaron a 37°C en medio LB con agitación constante a 225 rpm hasta una OD₆₀₀ cercana a 5.0. Se tomaron muestras cada hora y los resultados obtenidos fueron muy similares a los cuantificados anteriormente con el plásmido pECP64. La máxima inducción se refleja cuando está presente únicamente el 3O-C12-HSL, en los ensayos realizados anteriormente la proporción de los autoinductores

adicionados era de 10.0 μM de 3O-C12-HSL y 1.0 μM de C4-HSL. Cuando se invirtieron las concentraciones de los autoinductores no se reflejó una disminución mayor a la presentada en la adición de AIs 10:1, tampoco lo fue con proporciones de 1:1, Figura R15.

Esto sugiere que no existe una competencia directa entre ambos autoinductores por la unión a la proteína LasR o bien, que el C4-HSL no actúa a través de la unión a LasR.

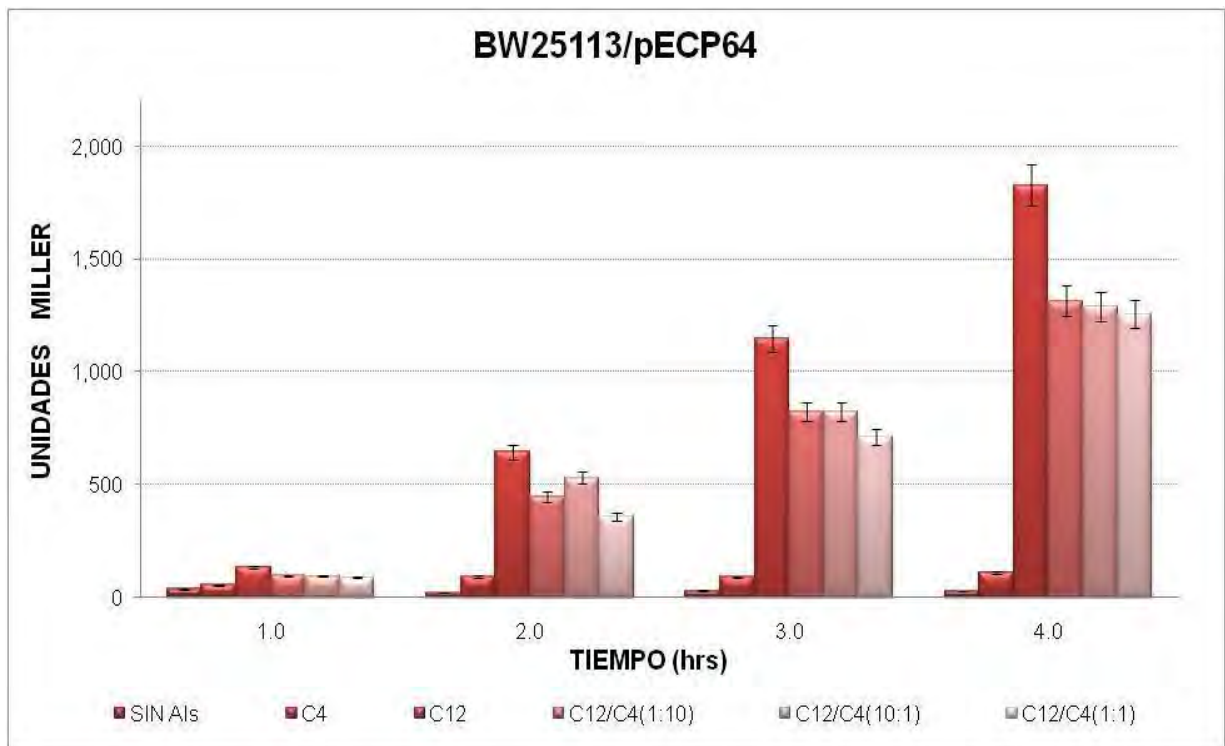


Figura R15. Concentraciones diferenciales de los autoinductores en *E. coli* BW25113 transformada con pECP64 no reflejó diferencias en la disminución de la inducción de la β -galactosidasa. Con la adición de 3O-C12-HSL se obtuvo la máxima inducción y con ambos autoinductores en concentraciones 1:10, 10:1 y 1:1 (μM) respectivamente, no se observaron diferencias significativas en la disminución en la actividad de la β -galactosidasa debidas a la presencia de C4-HSL.

3.2. Adición de C4-HSL posterior a la adición de 3O-C12-HSL.

Con el objetivo de determinar si la adición de C4-HSL posterior a la de 3O-C12-HSL en *E. coli* BW25113 transformada con pECP64, altera la actividad de la β -galactosidasa con respecto a aquella en la que se adicionó 3O-C12-HSL y C4-

HSL al mismo tiempo (t_0) se realizaron ensayos en medio LB a 37°C con agitación constante a 225 rpm. La adición de los autoinductores a cada uno de los matraces y los tiempos de adición se muestran en la tabla R2.

TIEMPO	1 hr.	2 hr.
MATRAZ No.		
1	SIN AUTOINDUCTOR	-----
2	3O-C12-HSL	-----
3	C4-HSL	-----
4	3O-C12-HSL/C4-HSL	-----
5	3O-C12-HSL	C4-HSL

Tabla R2 Adición posterior a la de 3O-C12-HSL de C4-HSL. En este ensayo se adiciona C4-HSL dos horas después de haber adicionado 3O-C12-HSL (matraz No. 5). Los matraces 1 y 3 son controles mientras que en el 2 se espera observar la activación dependiente de LasR:3O-C12-HSL. en el matraz No. 4 se observará la disminución de la activación dependiente de LasR:3O-C12-HSL debida a la presencia de C4-HSL.

Los resultados mostrados en la Figura R16 indican que la adición de ambos autoinductores en el mismo tiempo (t_0) disminuyen los niveles de la actividad de la β -galactosidasa con respecto al control suplementado con 3O-C12-HSL; sin embargo adición de C4-HSL en el tiempo t_2 , (posterior a la adición de 3O-C12-HSL), no muestra modificación en los niveles de activación de la β -galactosidasa respecto al suplementado únicamente con 3O-C12-HSL, Figura R16.

Estos datos sugieren que el C4-HSL ya no interacciona con la proteína LasR una vez que ésta ha formado complejo con el 3O-C12-HSL.

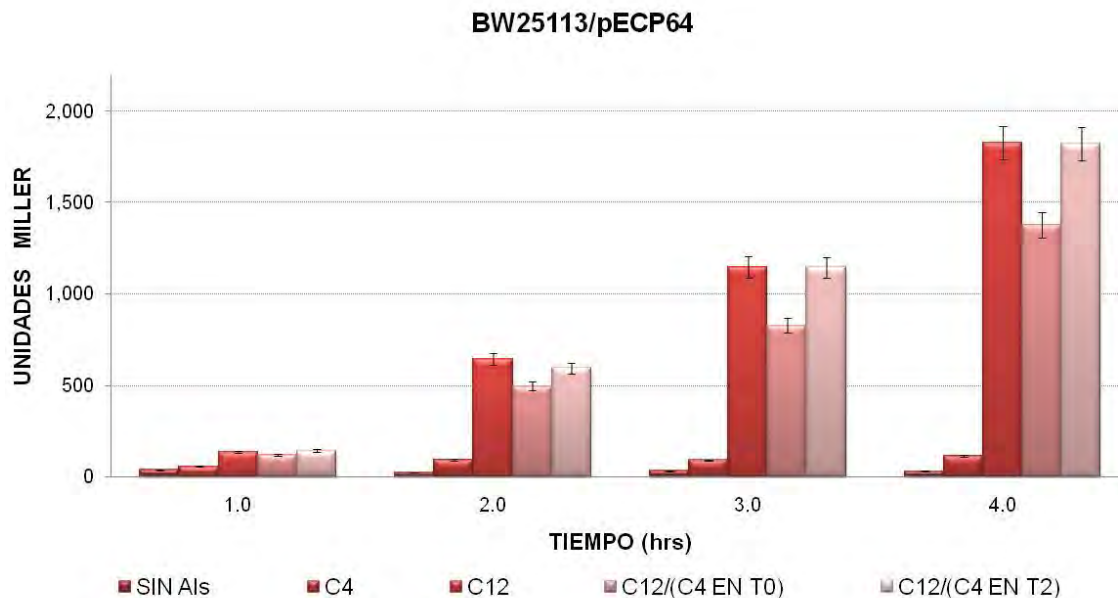


Figura R16. La adición de C4-HSL posterior a la adición de 3O-C12-HSL no modifica los niveles de inducción de la β -galactosidasa mostrados por la adición de 3O-C12-HSL. El ensayo se realizó en *E. coli* BW25113 transformada con pECP64 sin adición de autoinductores y adicionada con C4-HSL, 3O-C12-HSL, con ambos autoinductores en el tiempo t0 y con 3O-C12-HSL adicionado en t0 y C4-HSL en t2. La adición de C4-HSL posterior a la de 3O-C12-HSL no produce una disminución en la actividad de la β -galactosidasa manteniendo los mismos niveles de transcripción que en el caso de la adición de 3O-C12-HSL.

3.3. Adición de 3O-C12-HSL posterior a la de C4-HSL

Para determinar si la adición posterior de 3O-C12-HSL al C4-HSL altera los niveles de inducción de la β -galactosidasa en *E. coli*, BW25113 transformada con pECP64 con respecto a la inducción máxima observada con la adición de 3O-C12-HSL, se cultivó la cepa en medio LB a 37°C con agitación constante de 225 rpm hasta una OD₆₀₀ cercana a 5.0. Las condiciones de cada cultivo fueron: sin adición de Als, adicionado con C4-HSL, 3O-C12-HSL, con ambos Als en t0, adicionado con C4-HSL en t0 y en t2 el 3O-C12-HSL tomando muestras cada hora (Tabla R3). Los resultados indicaron que la adición de 3O-C12-HSL posterior a C4-HSL altera los niveles de inducción de la β -galactosidasa por LasR/3O-C12-HSL disminuyéndolos en un 25% aproximadamente, de la misma manera que si se hubiesen adicionado ambos Als al mismo tiempo, Figura R17.

TIEMPO	1 hr.	2 hr.
MATRAZ No.		
1	SIN AUTOINDUCTOR	-----
2	3O-C12-HSL	-----
3	C4-HSL	-----
4	3O-C12-HSL/C4-HSL	-----
5	C4-HSL	3O-C12-HSL

Tabla R3 Adición posterior a la de C4-HSL de 3O-C12-HSL. En este ensayo se adiciona 3O-C12-HSL dos horas después de haber adicionado C4-HSL (matraz No. 5). Los matraces 1 y 3 son controles mientras que en el 2 se espera observar la activación dependiente de LasR:3O-C12-HSL. en el matraz No. 4 se observará la disminución de la activación dependiente de LasR:3O-C12-HSL debida a la presencia de C4-HSL.

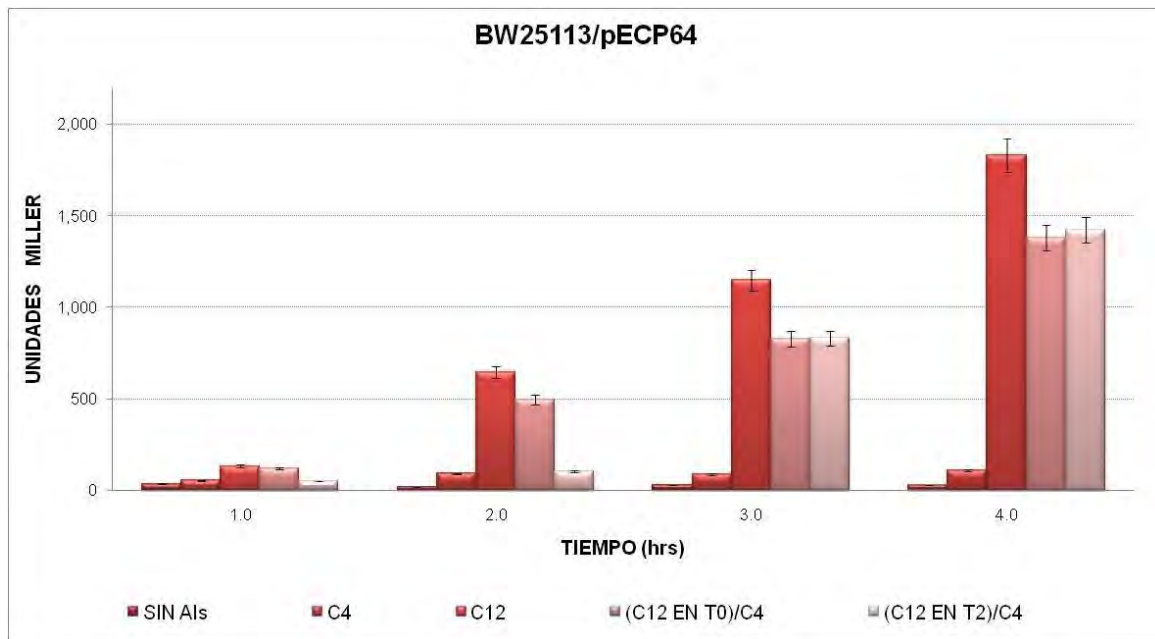


Figura R17. La adición de 3O-C12-HSL posterior a la de C4-HSL produce una disminución en la actividad de la β -galactosidasa cercana al 25% manteniendo los mismos niveles de inducción que en el caso de la adición de ambos AIs al mismo tiempo. El ensayo se realizó en *E. coli* BW25113 transformada con pECP64 sin adición de autoinductores y adicionada con C4-HSL, 3O-C12-HSL, con ambos autoinductores en el t0 y con ambos autoinductores: C4-HSL adicionado en t0 y 3O-C12-HSL en t2.

Estos resultados sugieren que el 3O-C12-HSL sí puede interaccionar con la proteínas LasR aún en presencia de C4-HSL, el efecto de la disminución de la transcripción causada por C4-HSL es evidente.

4. Obtención de mutantes de PAO1.

Debido a la evidencia obtenida en *E. coli* sobre la interacción de C4-HSL con el complejo LasR/3O-C12-HSL y sus implicaciones en la expresión de la fusión (pMP220 ϕ (*OP1lasB::lacZ*)) y de ambos operadores del gen *lasB* de *P. aeruginosa*, era necesario estudiar el comportamiento de su expresión en el fondo genético de *P. aeruginosa*.

Como se mencionó anteriormente, *P. aeruginosa* posee dos sistemas tipo LuxR/LuxI: los sistemas *las* y *rhl* los cuales funcionan de manera jerárquica para regular la expresión de los factores de virulencia. Para determinar si el autoinductor C4-HSL interaccionaba con el complejo LasR/3O-C12-HSL se requería la mutante PAO1 Δ *rhlR* la cual no produce RhlR. La falta de RhlR implica que el C4-HSL producido no estaría siendo atrapado por la proteína reguladora y se difundiría en el medio intra e intercelular e interaccionaría con el complejo LasR/3O-C12-HSL.

También se requería la doble mutante PAO1 Δ *rhlRrhII*. Esta mutante debería ser deficiente en la producción de la proteína reguladora RhlR y de la sintasa que cataliza la síntesis de C4-HSL. El sistema *las* estaría intacto admitiendo la adición de C4-HSL exógeno y permitiéndonos observar los patrones de expresión de la fusión (pMP220 ϕ (*OP1lasB::lacZ*)) dependiente del complejo LasR/3O-C12-HSL.

La mutante PAO1 Δ *rhII* sería deficiente en la síntesis de C4-HSL por la carencia de la sintasa respectiva. Es posible que la proteína reguladora RhlR se comporte como represor ante la ausencia de su autoinductor, así ésta ayudaría a observar los niveles de expresión de la fusión (pMP220 ϕ (*OP1lasB::lacZ*)) ante la presencia o ausencia de C4-HSL y el rol de represor o activador de la proteína reguladora.

4.1. Obtención de PAO1 Δ *rhII*, PAO1 Δ *rhlR* y PAO1 Δ *rhlRI*.

Para la obtención de las mutantes PAO1 Δ *rhII* y PAO1 Δ *rhII* Δ *rhlR* se utilizaron las cepas PAO1 *lecA::lux Δ rhII::Tc Δ pqsA* y PAO1 Δ *rhlR::Gm* como donadoras

realizando la transducción en PAO1 como receptora. Asimismo se utilizó como donadora la cepa PAO1 *lecA::luxΔrhII::TcΔpqsA* y como receptora a PAO1Δ*rhIR* para obtener por transducción la doble mutante PAO1Δ*rhIRI*.

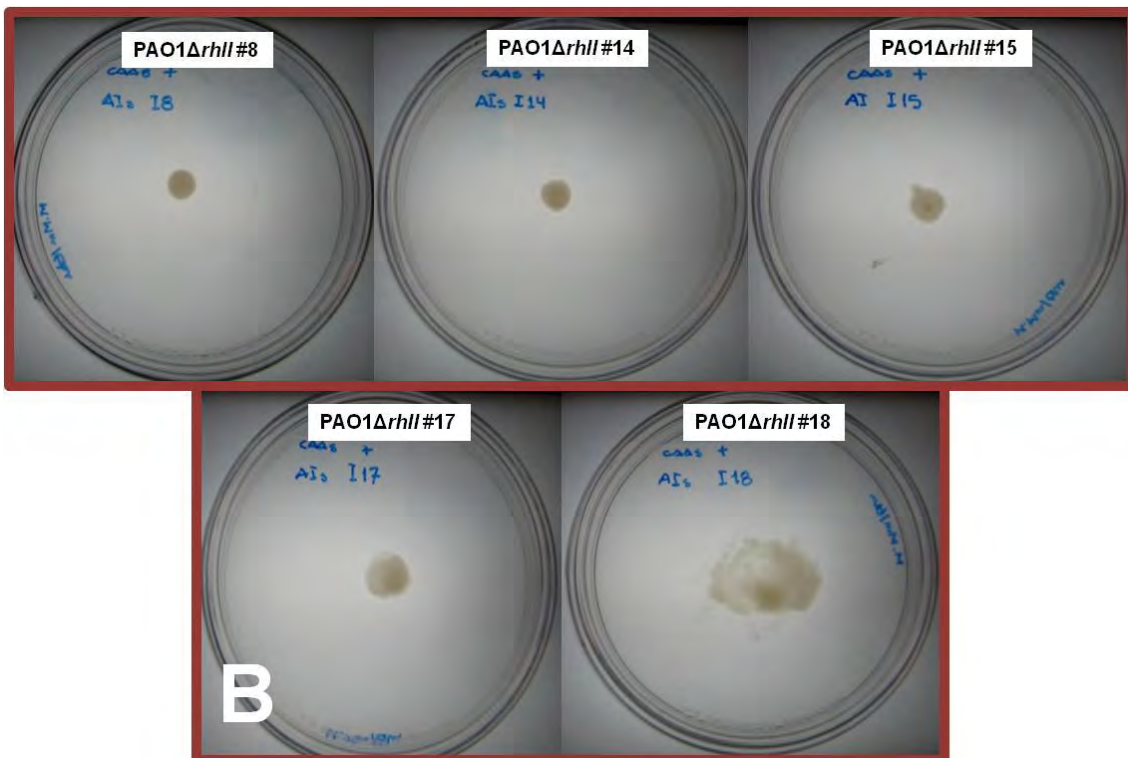
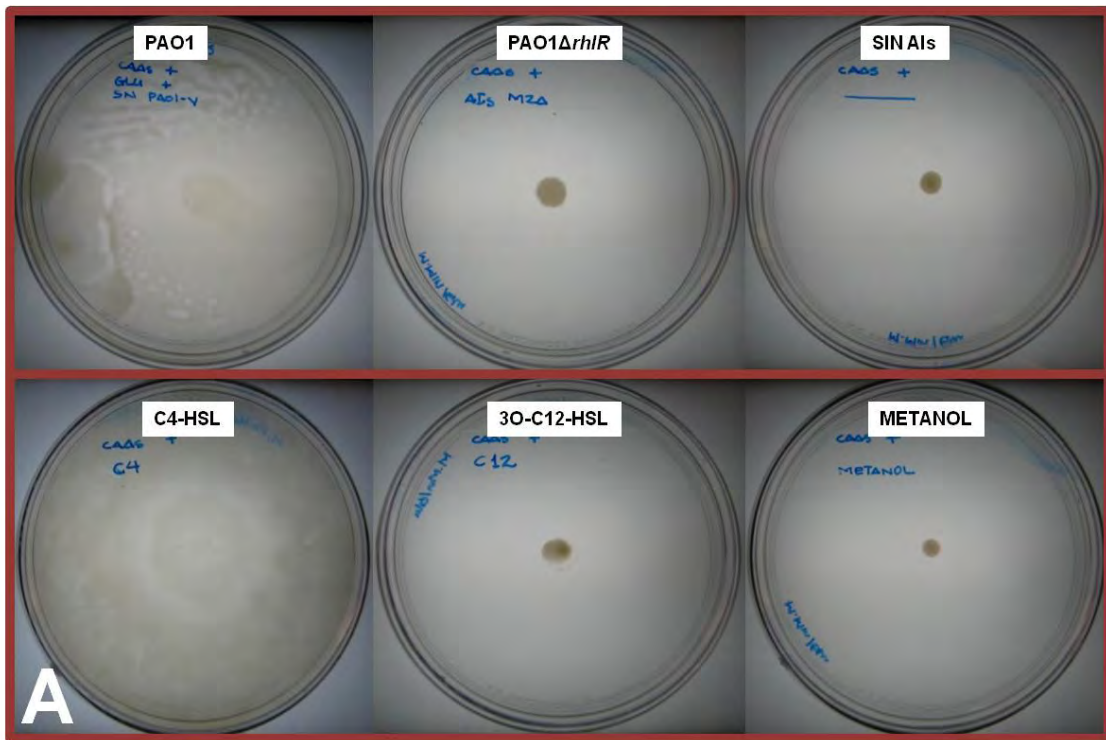
Las mutantes obtenidas fueron PAO1Δ*rhIR* Gm^R, PAO1Δ*rhII* Tc^R y PAO1Δ*rhIRI* Tc^RGm^R (Tabla R4).

CEPA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
PAO1 Δ <i>rhIR</i>	Gm ^R	Este estudio.
PAO1 Δ <i>rhII</i>	Tc ^R .	Este estudio.
PAO1 Δ <i>rhIRI</i>	Gm ^R Tc ^R	Este estudio.

Tabla R4. Mutantes obtenidas por transducción. Las cepas utilizadas y enlistadas en la Tabla MM1 se utilizaron como donadoras para transducir las mutaciones correspondientes en la cepa silvestre PAO1, obteniéndose las mutantes PAO1Δ*rhIR::Gm*, PAO1Δ*rhII::Tc* y PAO1Δ*rhIR::Gm ΔrhII::Tc*.

4.2. Determinación de la producción de N-Butanoil-homoserina lactona (C4-HSL).

Para la determinación cualitativa de la producción de N-Butanoil-homoserina lactona (C4-HSL) se utilizaron las cepas de *Serratia liquefaciens* silvestre (MG1) y mutante en el gen *swrI* (MG44) mediante la expresión de la motilidad tipo swarming ya que, como se mencionó anteriormente, la motilidad tipo swarming requiere de la expresión de un gen intacto *swrI* que codifica para la sintasa que cataliza la producción de C4-HSL. Primero se obtuvieron sobrenadantes y se extrajeron los autoinductores, el ensayo se realizó con ambos y los resultados fueron similares, aunque la intensidad de la motilidad tipo swarming se acentuó más en el ensayo realizado con los sobrenadantes. Los controles utilizados fueron los de la cepa silvestre (PAO1), Metanol (debido a que la resuspensión de los autoinductores extraídos se realiza con metanol grado HPLC), 3O-C12-HSL (3-oxo-dodecil-homoserina lactona) y C4-HSL. La Figura R18 nos muestra la expresión de la motilidad swarming de *Serratia liquefaciens* en cajas de Medio Mínimo AB suplementadas con 0.5% de casaminoácidos y los respectivos autoinductores extraídos de cada cepa de *P. aeruginosa*, tanto PAO1 como las transductantes obtenidas.



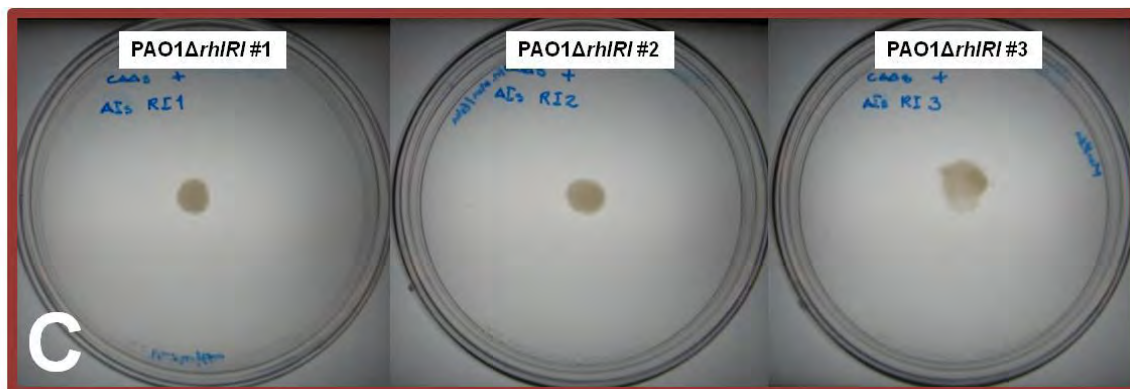


Figura R18. Determinación cualitativa de la producción de C4-HSL de las mutantes obtenidas por transducción. Las cajas contienen medio mínimo AB-agar 0.7% suplementado con 0.5% de casaminoácidos y con los autoinductores extraídos de cada cepa (indicado en el recuadro superior blanco). Cada caja se inoculó con 5 μ L de un cultivo de *Serratia liquefaciens* (MG44) mutada en el gen *swrI* y deficiente en la producción de C4-HSL. Las fotografías fueron tomadas después de 40 horas de incubación a 30°C.

Como se observa en la Figura R18 cada una de las cajas fue suplementada con los autoinductores extraídos de las cepas: PAO1, PAO1 Δ rhIR, sin suplementar AIs, con C4-HSL, 3O-C12-HSL y metanol como controles. Todas fueron inoculadas con 5 μ L de cultivo de *Serratia liquefaciens* (MG44) deficiente en la producción de C4-HSL. Únicamente en aquellas cajas en las que se adicionaron los autoinductores de PAO1 y C4-HSL se presentó la motilidad tipo swarming. En la figura R18 B y C las cajas fueron suplementadas con los autoinductores extraídos de las mutantes candidatas PAO1 Δ rhII y PAO1 Δ rhIRI respectivamente. De las 5 candidatas PAO1 Δ rhII, sólo las No.8, 14 y 15 no presentaron motilidad tipo swarming mientras que de las 3 candidatas PAO1 Δ rhIRI únicamente las No. 1 y 2 no presentaron motilidad tipo swarming. La ausencia del swarming indica que las mutantes no producen C4-HSL.

4.3. Cuantificación de la concentración de Ramnolípidos, Piocianina, Actividad proteolítica y Actividad Elastolítica.

Ochsner y colaboradores (1994a y b) detectaron una cepa deficiente en la producción de ramnolípidos (65E12) encontrando que ésta contenía un gen *rhIR* mutante, es decir, debido a una delección se corrió el marco de lectura produciendo una proteína incapaz de activar ciertos genes involucrados en la producción de ramnolípidos. De igual manera, la producción de piocianina se vio completamente afectada así como la actividad elastolítica. Asimismo, una mutante deficiente en la producción de C4-HSL es incapaz de producir ramnolípidos (Ochsner and Reiser, 1995) Figura R19.

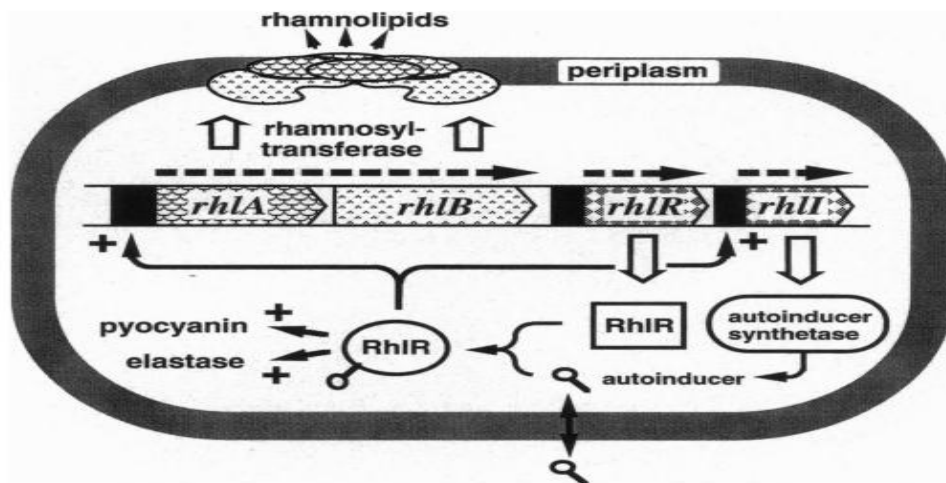


Figura R19. La producción de ramnolípidos y de piocianina se ve severamente afectada si los genes *rhIR* o *rhII* se encuentran mutados, (Ochsner *et al.*, 1994).

Basados en estos estudios se cuantificó la cantidad de ramnolípidos, piocianina y actividad elastolítica de la cepa silvestre (PAO1) y las transductantes obtenidas. Los niveles de ramnolípidos producidos por cada una de ellas se observan en la Tabla R5.

CEPA	Ramnolípidos (mg/ml)
PAO1	4.594
PAO1 <i>lecA::luxΔrhIRΔpqsA</i>	0.040
PAO1 Δ <i>rhIR</i> (transductante)	0.246
PAO1 Δ <i>rhII</i> (transductante)	0.015
PAO1 Δ <i>rhIRI</i> (transductante)	0.268

Tabla R5. La determinación de la concentración de ramnolípidos se realizó después de 18 hrs de cultivo en medio PPGAS mediante la técnica del orcinol por triplicado de las cepas silvestre (PAO1) y las mutantes obtenidas por transducción (PAO1 Δ *rhII*, PAO1 Δ *rhIR*, PAO1 Δ *rhIRI*).

Para verificar que la deficiencia en la producción de ramnolípidos se debía a los genes mutados (*rhIR*, *rhII*, *rhIRI*) se realizaron ensayos de complementación. La transductante PAO1 Δ *rhIR* se complementó con el plásmido pGMYC que posee al gen *rhIR* bajo el promotor *lac*; la transductante PAO1 Δ *rhII* se complementó adicionando el medio de cultivo con 10 μ M de C4-HSL (Biochemika Fluka) y la doble mutante PAO1 Δ *rhIRI* se complementó primero con C4-HSL para determinar inicialmente la disfuncionalidad del gen *rhIR* (Figura R20).

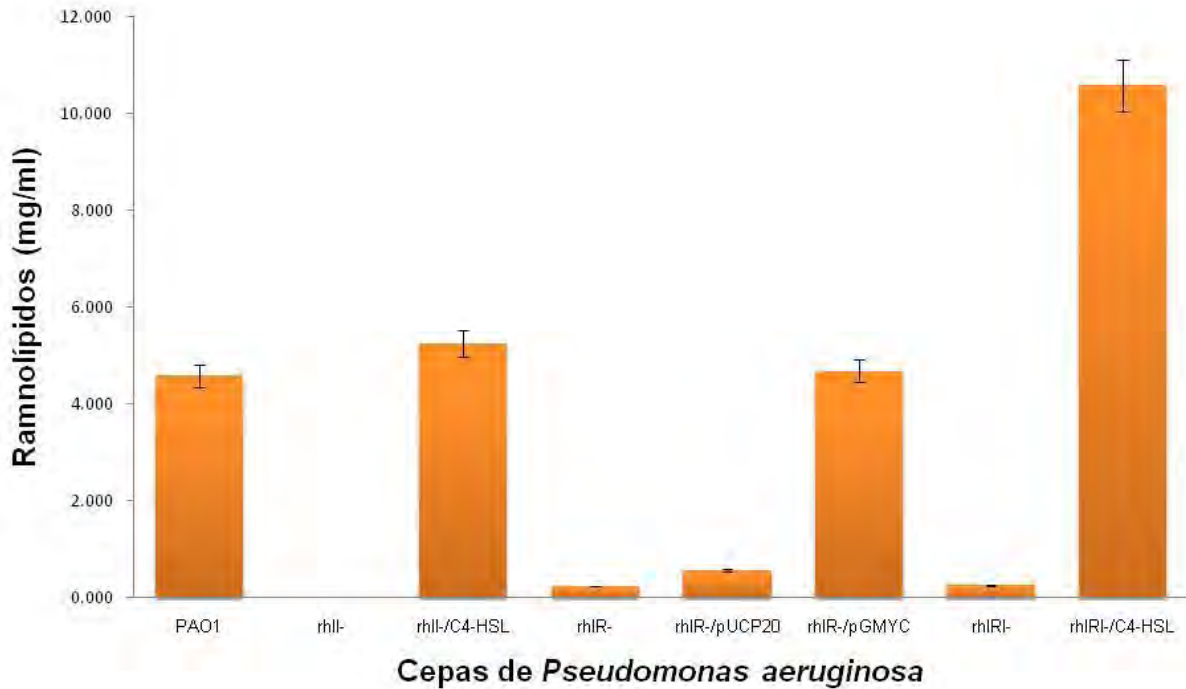


Figura R20. Los ensayos de complementación mostraron que la mutante PAO1 Δ *rhII* posee un gen *rhII* disfuncional, la mutante PAO1 Δ *rhIR* posee también un gen *rhIR* disfuncional, sin embargo, la complementación de la doble mutante demostró que ésta posee un gen *rhII* disfuncional y un gen *rhIR* funcional.

Los ensayos de complementación mostraron que el gen *rhII* es disfuncional en la mutante PAO1 Δ *rhII* ya que al complementar con 10 μ M de C4-HSL los niveles de concentración de ramnolipidos se restauraron cerca de un 15% más que la PAO1. Asimismo los niveles de concentración de ramnolipidos en la transductante PAO1 Δ *rhIR* se recuperaron al 100% con la transformación con el plásmido pGMYC; en este caso se complementó con el plásmido pUCP20 como control ya que éste fue el vector a partir del cual se construyó pGMYC. La doble mutante PAO1 Δ *rhIRI* fue complementada únicamente con 10 μ M de C4-HSL. Los resultados obtenidos mostraron que la cepa fue capaz de restaurar los niveles de concentración de ramnolipidos en un 130% más que PAO1, lo cual es indicativo de que posee un gen *rhII* mutado pero un gen *rhIR* cuyo producto parece ser igual o más funcional que el de la cepa silvestre.

Con los mismos ensayos de complementación se midió la concentración de piocianina. Los resultados obtenidos fueron muy similares que los obtenidos en la concentración de ramnolípidos, Figura R21.

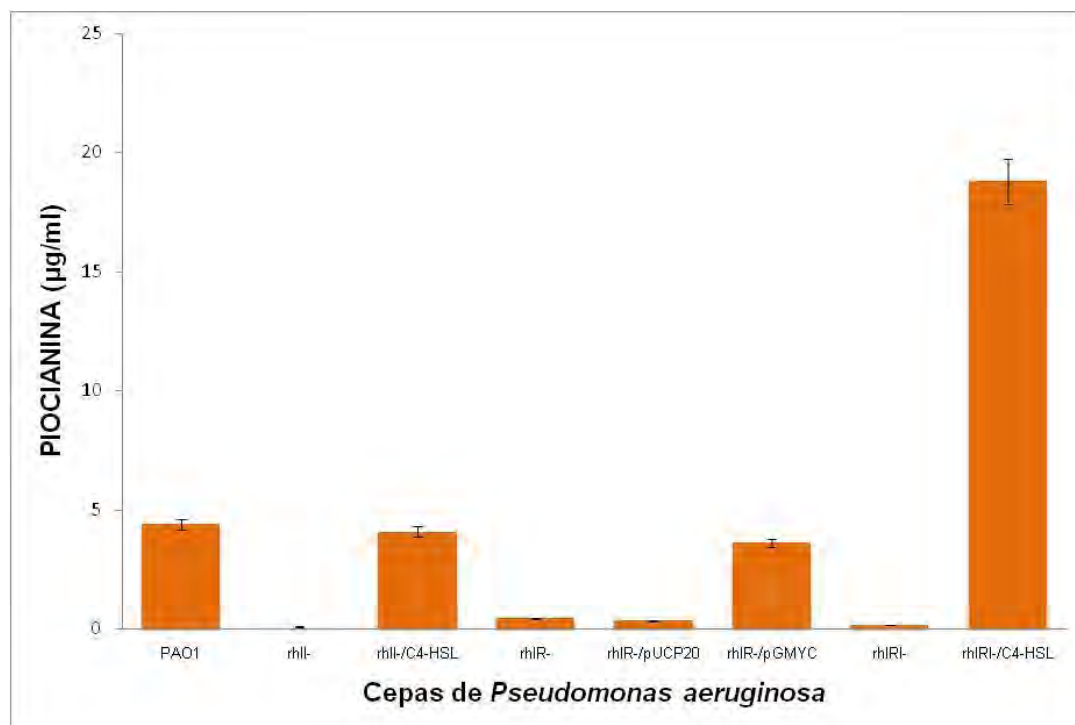


Figura R21. Los ensayos de complementación mostraron que la mutante PAO1 Δ rhII posee un gen *rhII* disfuncional y la concentración de piocianina, la mutante PAO1 Δ rhIR posee también un gen *rhIR* disfuncional, sin embargo, la complementación de la doble mutante demostró que ésta posee un gen *rhII* disfuncional y un gen *rhIR* funcional.

Para complementar la mutante PAO1 Δ rhII se adicionaron al cultivo 10 μ M de C4-HSL lo que restauró casi al 100% la producción de Piocianina. Para complementar la mutante PAO1 Δ rhIR, ésta se transformó con el plásmido pGMYC que contiene al gen *rhIR* bajo el promotor *lac* y la producción de piocianina se restauró en casi un 85% con respecto a la producción de PAO1. La doble mutante fue complementada únicamente con 10 μ M de C4-HSL para verificar que el gen *rhIR* era disfuncional, sin embargo la adición del autoinductor elevó la producción

de piocianina en más de un 400% lo que indica que el producto del gen *rhIR* es funcional.

La actividad proteolítica se determinó cualitativamente en cajas de medio PY-agar 1.5% suplementadas con leche (DIFCO) al 1%. Cada caja fue inoculada con 5 ml de cultivo de PAO1 (cepa silvestre), PAO1 Δ *rhII*, PAO1 Δ *rhIR*, PAO1 Δ *rhIRI* y PAO1 Δ *lasR*. A las 12 horas PAO1 presentó un halo amplio alrededor del inóculo así como PAO1 Δ *rhIR* y las candidatas PAO1 Δ *rhII* aunque el diámetro del halo fue menor, PAO1 Δ *lasR*, PAO1 Δ *rhIRI* no presentaron halo, es decir, la actividad proteolítica estaba totalmente inactiva, (Tabla R6, Figura R22).

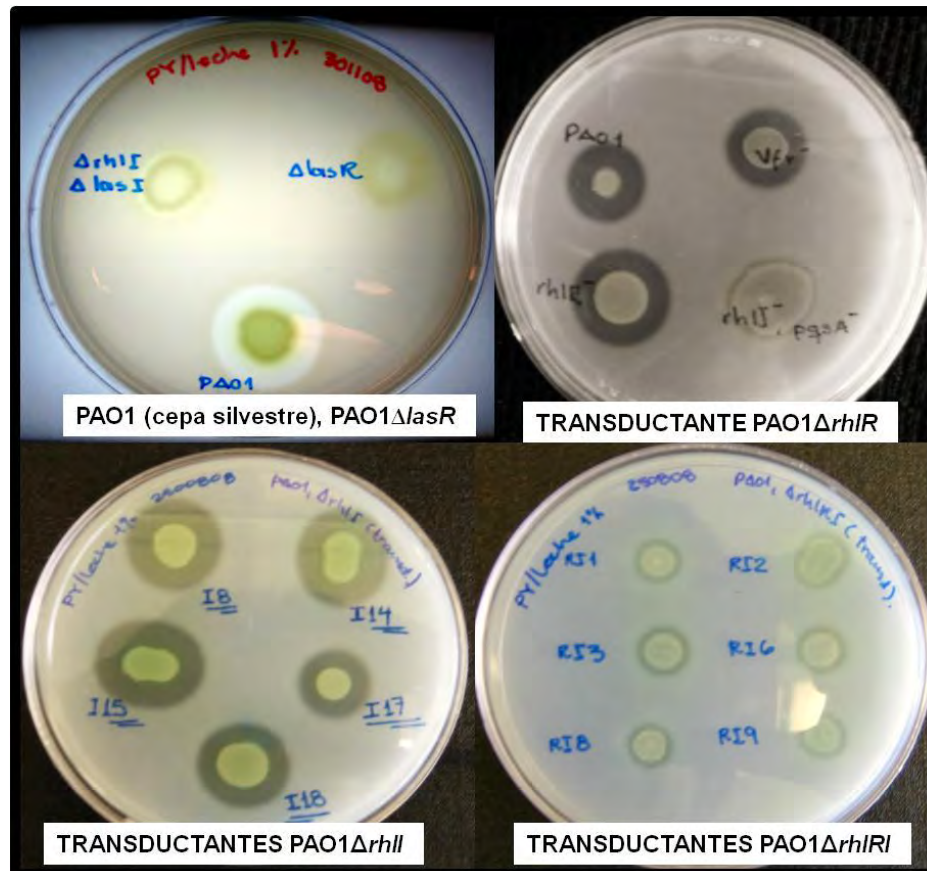


Figura R22. Actividad de proteasas totales de las mutantes obtenidas por transducción PAO1 Δ *rhIR* (Gm^R), PAO1 Δ *rhII* (Tc^R) y PAO1 Δ *rhIRI* ($Tc^R Gm^R$). Tanto la cepa silvestre PAO1 como las transductantes PAO1 Δ *rhIR* y PAO1 Δ *rhII* presentaron actividad de proteasas totales, mientras que PAO1 Δ *lasR* y las transductantes PAO1 Δ *rhIRI* no presentaron actividad de proteasas.

CEPA	ACTIVIDAD DE PROTEASAS TOTALES.
PAO1	Sí
PAO1 $\Delta rhIR$	Sí
PAO1 $\Delta rhII$ (transductantes)	Sí
PAO1 $\Delta rhIRI$ (transductantes)	No
PAO1 $\Delta lasR$	No

Tabla R6. Actividad de proteasas totales de las mutantes obtenidas por transducción PAO1 $\Delta rhIR$ (Gm^R), PAO1 $\Delta rhII$ (Tc^R) y PAO1 $\Delta rhIRI$ (Tc^RGm^R). Tanto la cepa silvestre PAO1 como las transductantes PAO1 $\Delta rhIR$ y PAO1 $\Delta rhII$ presentaron actividad de proteasas totales, mientras que PAO1 $\Delta lasR$ y las transductantes PAO1 $\Delta rhIRI$ no presentaron actividad de proteasas.

De acuerdo a lo reportado por Brint y Ohman (1995) la síntesis de elastasa, proteasa LasA y proteasas que degradan caseína disminuyen severamente en una mutante del gen *rhIR* en *P. aeruginosa*, evidencia que fortaleció la hipótesis de que el C4-HSL producido y sin posibilidad de interactuar con su propia proteína reguladora *RhIR* interactuaba con el complejo LasR/3O-C12-HSL impidiendo la síntesis óptima de proteasas totales. Sin embargo esta evidencia no pudo utilizarse debido a que no se pudo reproducir lo descrito por este grupo de investigación.

De esta manera no pudo evaluarse la hipótesis de que en una doble mutante PAO1 $\Delta rhIRI$ recuperaría su actividad proteolítica pues los resultados obtenidos muestran que no pudo construirse por transducción debido a ambos genes son contiguos y la recombinación homóloga parece haber producido un gen *rhIR* cuyo producto es funcional.

Por otro lado, se midió la actividad elastolítica mediante un método colorimétrico que nos permite cuantificar la actividad elastolítica de la elastasa (LasB). Se midió la actividad elastolítica en la cepa silvestre PAO1 y las mutantes PAO1 $\Delta rhIR$, PAO1 $\Delta rhII$ y PAO1 $\Delta rhIRI$, las tres mutantes fueron complementadas, la primera con el plásmido pGMYC que contiene al gen *rhIR* bajo el promotor *lac* y las dos últimas con 10 μ L de C4-HSL. La mutante PAO1 $\Delta rhII$ disminuyó su

actividad hasta un 27% y la complementación con C4-HSL recuperó la actividad elastolítica en un 76% comparado con PAO1. La mutante PAO1 Δ *rhIR* disminuyó su actividad hasta un 4% y la complementación con RhIR la restituyó hasta un 70% comparado con PAO1. Finalmente la doble mutante PAO1 Δ *rhIRI* disminuyó su actividad en un 98% pero la complementación con 10 μ L de C4-HSL restituyó los valores de la actividad hasta un 44% con respecto a PAO1, Figura R23.

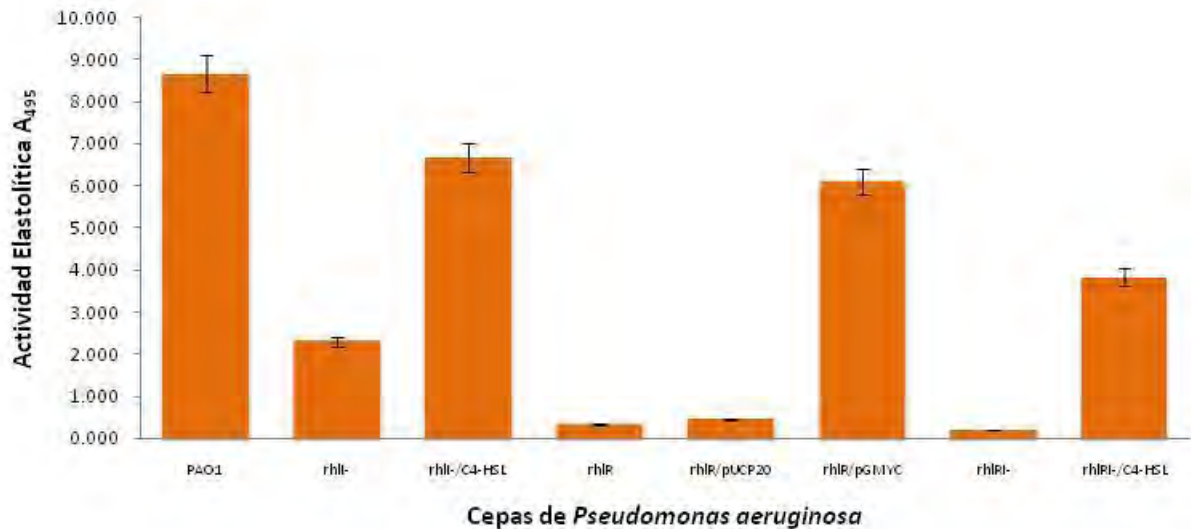


Figura R23. Actividad elastolítica de las mutantes obtenidas por transducción PAO1 Δ *rhIR* (GmR), PAO1 Δ *rhII* (TcR) y PAO1 Δ *rhIRI* (Tc^RGm^R). Tanto la cepa silvestre PAO1 como las transductantes PAO1 Δ *rhII* presentaron actividad elastolítica, mientras que PAO1 Δ *rhIR* y las transductantes PAO1 Δ *rhIRI* no presentaron actividad. Sin embargo en estos dos últimos casos al complementarlas se recuperó la actividad.

En este sentido, se pudo corroborar el hecho de que una mutante en el gen *rhII* la actividad elastolítica disminuye drásticamente mientras que en una mutante del gen *rhIR* no produce elastasa. Una explicación se basa en que en una mutante en *rhII* la proteína RhIR puede estar actuando como represor del gen *lasB*; mientras que en una mutante en *rhIR*, el C4-HSL producido por la sintasa codificada por el gen *rhII* estaría aboliendo la actividad del complejo LasR/3O-C12-HSL.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos de este proyecto, podemos concluir que el autoinductor C4-HSL reduce la actividad transcripcional de LasR sobre el promotor del gen *lasB* siempre que éste se encuentre presente cuando aún no se ha formado el complejo LasR/3O-C12-HSL. Esta actividad reguladora formaría un circuito que permitiera la regulación del sistema y así poder alcanzar distintos estados en la respuesta Quorum Sensing, Figura R24.

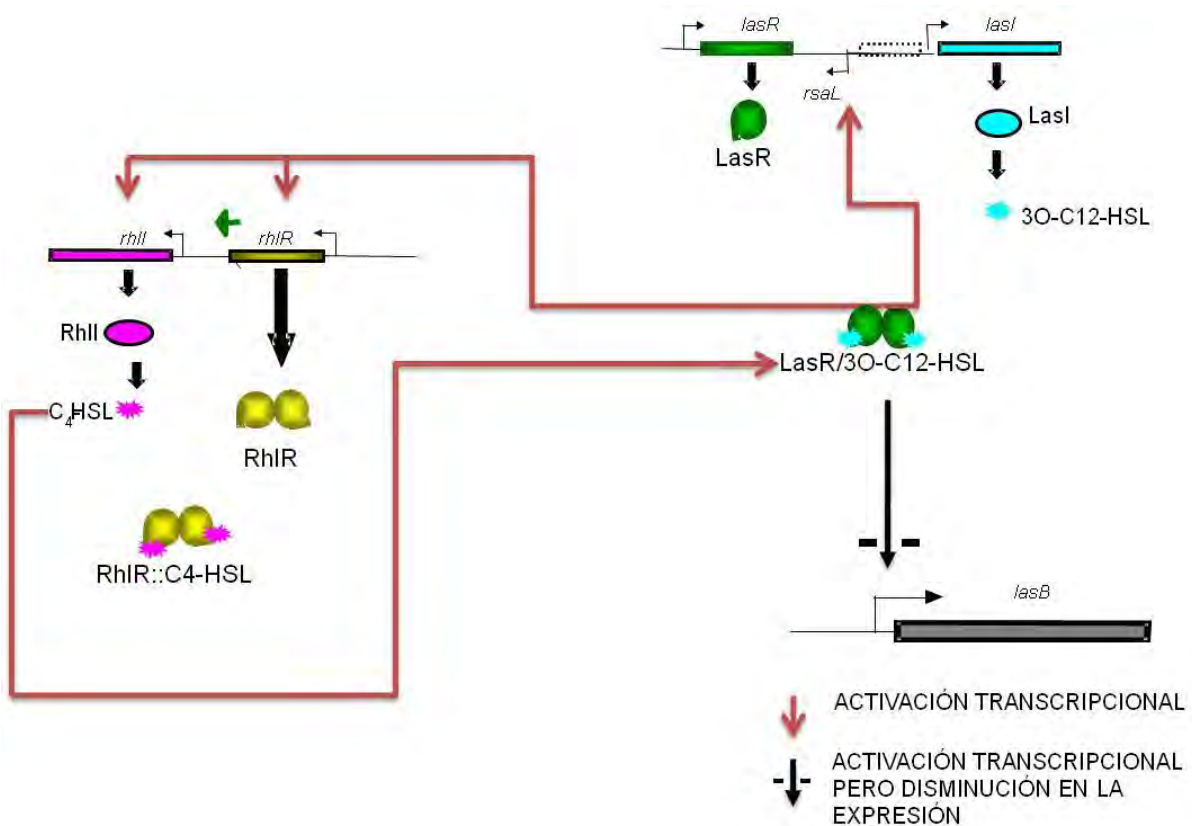


Figura R24. Circuito regulador. La presencia del autoinductor C4-HSL modifica la interacción del complejo LasR/3O-C12-HSL con el OP1 y OP2 del gen *lasB* reduciendo la actividad transcripcional dependiente de este complejo.

PERSPECTIVAS

No son pocas las perspectivas derivadas de este proyecto, sin embargo creemos que las más importantes serían:

- Determinar si en *Pseudomonas aeruginosa* el autoinductor C4-HSL modifica la actividad transcripcional de LasR mediante una doble mutante PAO1 Δ rhIRI.
- Determinar si la presencia del C4-HSL disminuye la capacidad del complejo LasR/3O-C12-HSL de unirse a su secuencia blanco de DNA (OP1 y OP2) en el gen *lasB*.
- Determinar si el autoinductor C4-HSL modifica el estado oligomérico de LasR.

LITERATURA CITADA

Albus, A.M., Pesci, E.C., Runyen-Janecky, L.J., West, S.E., and Iglewsky, B.H., (1997). Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 179:3928-3935.

Anderson, R.M., Zimprich, C.A., and Rust, L., (1999). A second operator is involved in *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) activation. *J. Bacteriol.* 181:6264-6270.

Azghani, A.O., Idell, S., Bains, M., and Hancock, R.E., (2002). *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesion in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb. Pathogen.*, 33:109-114.

Baldwin, T.O., Devine, J.H., Heckel, R.C., Lin, J.W., and Shadel, G.S., (1989). The complete nucleotide sequence of the *lux* regulon of *Vibrio fischeri* and the *luxABN* region of *Photobacterium leionnathi* and the mechanism of control of bacterial luminescence. *J. Biolum. Chemilumin.* 4:326-341.

Barbieri, J.T., (2000). *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S, a bifunctional type-III secreted cytotoxin. *Int. J. Med. Microbiol.*, 290:381-387.

Beare, P.A., For, R.J., Martin, L.W., and Lamont, I.L., (2003). Siderophore-mediated cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*: Divergent pathways regulate virulence factor production and siderophore receptor synthesis. *Mol. Microbiol.*, 47:195-207.

Beatson, S.A., Whitchurch, C.B., Sargent, J.L., Levesque, R.C., and Mattick, J.S., (2002). Differential regulation of twitching motility and elastase production by Vfr in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 184:3605-3613.

Berk, R.S., Brown, D., Coutinho, I., and Meyers D., (1987). *In vivo* studies with two phospholipase C fraction from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.*, 55:1728-1730.

Braun, P., Tommassen, J., and Filloux, A., (1996). Role of the elastase in folding and secretion of elastase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.*, 19:297-306.

Brint, J.M., and Ohman, D.E., (1995). Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the 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.

Budzik, J.M., Rosche, W.A., Rietsch, A., and O'toole G.A., (2004). Isolation and characterization of a generalized transducing phage for *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14. *J. Bacteriol.*, 186:3270-3273.

Chandrasekaran, E.V, and Bemiller, J.N., (1980). Constituent analyses of glycosaminoglycans. *Methods Carbohydr. Chem.*, 8:89-96.

Chungani, S.A., Whiteley, M., Lee, K.M., D'Argenio, D., Manoil, C., and Greenberg, E.P., (2001). QscR, a modulator of quorum sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:2752-2757.

Clark, D.J., and Maaloe, O., (1967). DNA replication and division cycle in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 23:99-112.

Datsenko, K.A., & Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:6640-6645.

de Bentzmann, S., Roger, P., and Puchelle, E., (1996). *Pseudomonas aeruginosa* adherence to remodeling respiratory epithelium. *Eur. Respir. J.*, 9:2145-2150.

de Bentzmann, S., Roger, P., Bajolet-Laudinat, O., Fuchey, C., Plotkowski, M.C., and Puchell, E., (1996). Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.*, 64:1582-1588.

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

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

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

De Vos, P., van Landschoot, A., Segers, P., Tytgat, R., Gillis, M., Bauwens, M., Rossau, R., Goor, M., Pot, B., Kersters, K., Lizzaraga, P., and De Ley, J., (1989). Genotypic relationships and taxonomic localization of unclassified *Pseudomonas* and *Pseudomonas*-like strains by deoxyribonucleic acid:ribosomal ribonucleic acid hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39:35-49.

Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lépine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., Xiao, G., and Rahme, L.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-homoserine lactones. *Mol. Microbiol.*, 55:998-1014.

Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., He, J., Mindrinos, M.N., Tompkins, R.G., and Rahme, I.G., (2004). Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hidroxi-2-alquilquinolinas (HAQs) reveals a rol for 4-hidroxi-2-heptilquinolina in cell-to-cell communications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 1339-1344.

Diggle, S.P., Matthijs, S., Wright, V.J., Fletcher, M.P., Chhabra, S.R., Lamont, I.L., et al. (2007) The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chem. Biol.*, 14: 87–96.

Duong, F., Bonnet, E., Geli, V., Lazdunski, A., Murgier, M., and Filloux, A., (2001). The AprX protein of *Pseudomonas aeruginosa*: A new substrate for the Apr type I secretion system. *Gene*, 262:147-153.

Eberl, L., Winson, M.K., Sternberg, C., Steward, G.S.A.B., Christiansen, G., Chhabra, S.R., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S., and Givskov, M., (1996). Involvement of N-acyl-L-homserine lactone autoinducers in controlling the multicelular behavior of *Serratia liquefaciens*. *Mol. Microbiol.*, 20:127-136.

Engel, L.S., Hill, J.M., Caballero, A.R., Green, L.C., and O'Callaghan, R.J., (1998) Protease IV, a unique extracellular protease IV and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, 273:16792-16797.

Engel, L.S., Hobden, J.A., Moreau, J.M., Callegan, M.C., Hill, J.M., and O'Callaghan, R.J., (1997). *Pseudomonas* deficient in protease IV has significantly reduced corneal virulence. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 38:1535-1542.

Essar, D.W., Eberly, L., and Crawford, I.P., (1990). Evolutionary differences in chromosomal locations of four early genes of tryptophan pathway in fluorescent pseudomonads: DNA sequences and characterization of *Pseudomonas putida* *trpE* and *trpGDC*. *J. Bacteriol.*, 172:867-883.

Farrow III, J.M., Sund, Z.M., Ellison, M.L., Wade, D.S., Coleman, J.P., and Pesci, E.C., (2008). PqsE functions independently of PqsR-*Pseudomonas* quinolone signal and enhances the rhl Quorum-Sensing system. *J. Bacteriol.* 190:7043-7051.

Filloux, A., Michel, G., and Bally, M., (1998). GSP-dependent protein secretion in Gram-Negative bacteria: The Xcp system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 22:177-198.

Frank, D.W., (1997). The exoenzymes S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 26:621-629.

Frithz-Lindsten; E., Holmstrom, A., Jacobsson, L., Soltani, M., Olsson, J., Rosqvist, R., and Forsberg, A., (1998). Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol. Microbiol.*, 29:1155-1165.

Fuqua, W., Winans, S., and Greenberg, E., (1994). Quorum Sensing in bacteria: the LuxR/LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, 176:269-275.

Gallager, L.A., and Manoil, C., (2001). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J. Bacteriol.*, 183:6207-6214.

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

Gallant, C.V., Raivio, T.L., Olson, J.C., Woods, D.E., and Storey, D.G., (2000). *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis clinical isolates produce exotoxin A with altered ADP-ribosyltransferase activity and cytotoxicity. *Microbiology*, 146:1891-1899.

Galloway, D.R. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: Recent developments. *Mol. Microbiol.*, 5:2315-2321.

Gambello, M.J., Kaye, S., and Iglewski, B.H., (1993). LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect. Immun.*, 61:1180-1184.

Gustin, J.K., Kessler, E., and Ohman, D.E., (1996). A substitution at His-120 in the LasA protease of *Pseudomonas aeruginosa* blocks enzymatic activity without affecting propeptide processing or extracellular secretion. *J. Bacteriol.*, 178:6608-6617.

Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166:577-580.

Heck, L.W., Alarcon, P.G., Kulhavy, R.M., Morihara, K., Russell, M.W., and Mestecky, J.F., (1990). Degradation of IgA proteins for *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect. Immunol.*, 6:2253-2257.

Heck, L.W., Morihara, K., McRae, W.B., and Miller, E.J., (1986). Specific cleavage of human type III and IV collagen by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect. Immun.*, 51:115-118.

Hentzer, M., Wu, H., Andersen, J.B., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Bagge, N., Kumar, N., Schembri, M.A., Song, Z., Kristoffersen, P., et al. (2003). Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *Embo. J.*, 22:3803-3815.

Holloway, B.W., and Krishnapillai, V., (1975). Bacteriophages and bacteriocins, p. 99-132. In P. H. Clarke and M. H. Richmond (ed.), *Genetics and biochemistry of Pseudomonas*. John Wiley and Sons, London.

Holloway, B.W., Egan, J.B., and Monk, M., (1960). Lysogeny in *Pseudomonas aeruginosa*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 38:321-330.

Hong, Y. and Ghebrehiwet, B., (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin. Immun. Immunopath.*, 62:133-138.

Howe, T.R., and Iglewsky, B.H., (1984). Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and in a mouse eye model. *Infect. Immun.*, 43:1058-1063.

Jacquot, J., Tournier, J., and Pachel, E., (1985). In vitro evidence that human airway lysozyme is cleaved and elastase by *Pseudomonas aeruginosa* elastase and not by human leukocyte elastase. *Infect. Immun.*, 47:555-560.

Jaffar-Bandejee, M.C., Lazdunski, A., Bally, M., Carrere, J., Chazalotte, J.P., and Galabert, C., (1995). Production of elastase, exotoxin A and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.*, 33:924-929.

Jarvis, F.G., and Johnson, M.J., (1949). A glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Am. Chem. Soc.*, 71:4124-4126.

Kessler, E., and Safrin, M., (1988). Partial purification and characterization of an inactive precursor of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Bacteriol.*, 170:1215-1219.

Kessler, E., Sfrin, M., Olson, J.C., and Ohman, D.E. (1993). Secreted LasA of *Pseudomonas aeruginosa* is a staphylolytic protease. *J. Biol. Chem.*, 268:7503-7508.

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

Konig, B., Jaeger, K.E., Sage, A.E., Vasil, M.L., and Konig, W., (1996). Rol de *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes and monocytes). *Infect. Immun.*, 64:3252-3258.

Lamb, J.R., Patel, H., Montminy, T., Wagner, V.E., and Iglewski, B.H., (2003). Functional domains of the RhIR transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 185:7129-7139.

Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., and Vasil, M.L., (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:7072-7077.

Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., and Lazdunski, A., (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional actiators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol. Microbiol.*, 21:1137-1146.

Latifi, A., Winson, M., Foglino, M., Bycroft, B., Steward, G., and Lazdunski, A., (1995). Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.*, 17:333-343.

Lazdunski, A.M., Ventre, I., and Sturgis, J.N., (2004). Regulatory circuits and communications in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2:581-592.

Ledgham, F., Ventre, I., Soscia, C., Foglino, M., Sturgis, J.N., and Lazdunski, A., (2003). Interaction of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhIR. *Mol. Microbiol.*, 48:199-210.

Marsh, J.L., Erfle, M., Wykes, E.J., (1984). The pic plasmid and phage vectors with versatile cloning site for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene*, 32:481-485.

Martínez, A., Ostrovsky, P., and Nunn D.N., (1999). LipC a second lipase of *Pseudomonas aeruginosa*, es LipB and Xcp dependent and is transcriptionally regulated by pillus biogenesis components. *Mol. Microbiol.*, 34:317-326.

McGrath, S., Wade, D.S., and Pesci, E.C., (2004). Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). *FEMS Microbiol. Lett.*, 230:27-34.

McIver, K., Kessler, E., and Ohman, D.E., (1991). Substitution of active-site His-223 in *Pseudomonas aeruginosa* elastase expression of the mutated *lasB* alleles in *Escherichia coli* show evidence for autoproteolytic processing of proelastase. *J. Bacteriol.*, 173:7781-7789.

McKnight, S.L., Iglewski, B.H., and Pesci, E.C., (2000). The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 182:2702-2708.

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

Medina, G., Juárez, K., Valderrama, B., and Soberón-Chávez, G. (2003b). Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J. Bacteriol.*, 185:5976-5983.

Meyers, D.J., Palmer, K.C., Bale, L.A., Kernacki, K., Preston, M., Brown, T., and Berk, R.S., (1992). *In vivo* and *In vitro* toxicity of phodpholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxicon.*, 30:161-169.

Migula, W., (1894). Über ein neues System der Bakterien. *Arb. Bakteriol. Inst. Karlsruhe.*, 1:235-238.

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

Nicas, T.I., and Iglewski, B.H., (1985). The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, 31:387-392.

O'Callaghan, R.J., Engel, L.S., Hobden, J.A., Callegan, M.C., Green, L.C., and Hill, J.M., (1996). *Pseudomonas* keratitis. The rol of an un characterized exoprotein, protease IV, in corneal virulence. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37:534-543.

O'toole, G.A., and Kolter, R., (1998). Flagellar and twitching motility is necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.*, 30:295-304.

Obden, J.A., (2002). *Pseudomonas aeruginosa* proteases and corneal virulence. *DNA Cell Biol.*, 21:391-396.

Ochsner U.A., Koch, A.K., Fiechter, A., and Reiser, J., (1994a). Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 176:2044-2054.

Ochsner, U.A., and Reiser, J., (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6424-6428.

Ochsner, U.A., and Reiser, J., (1995). Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6424-6428.

Ochsner, U.A., Fiechter, A., and Reiser, J., (1994). Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J. Biol. Chem.*, 269:18787-19795.

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

Ostroff, R.M., Wretling, B., and Vasil, M.L., (1989). Mutations in the hemolytic-phospholipase C operon result in decreased virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 grown under phosphate-limiting conditions. *Infect. Immun.*, 57:1369-1373.

Palleroni, N.J., (1993). *Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria. *Antoine Van Leeuwenhoek-Int. J. Microbiol.*, 64:231-251.

Palleroni, N.J., (2003). Prokaryote taxonomy of the 20th century and the impact of studies on the Genus *Pseudomonas*: a personal view. *Microbiol.*, 149:1-7.

Palleroni, N.J., (2005). Genus I. *Pseudomonas*, p. 323-379. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Part B. The gammaproteobacteria. Springer, New York.

Pearson, J.P., Pesci, E.C., and Iglewski, B.H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* Quorum-Sensing systems in control of elastasa and rhamnolipid biosynthesis genes. *J. Bacteriol.*, 179:5756-5767.

Pesci, E., and Iglewski, B.H., (1999). Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. In Cell-Cell signaling in bacteria. (Washington D.C., American Society for Microbiology Press), pp.147-155.

Pesci, E.C., and Iglewski, B.H., (1997a). The chain of command in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing. *Trends Microbiol.*, 5:132-134.

Pesci, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., and Iglewski, B.H., (1997b). Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 179:3127-3132.

Pollack, M., (2000). *Pseudomonas aeruginosa*. In G.L. Mandell, J.E., Benett, and R. Dolin (eds), Principles and practice of infectious diseases., pp. 2310-2335. Churchill Livingstone, New York.

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

Rahme, L.G., Stevens, E.J., Wolfort, S.F., Shao, J., Tompkins, R.G., and Ausubel, F.M., (1995). Common virulence factor for bacterial pathogenicity in plant and animals. *Science*, 268:1899-1902.

Ramphal, R., Arora, S.K., and Ritchings, B.W., (1996). Recognition of mucin by the adhesion-flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 154:S170-S174.

Ramphal, R., Small, P.M., Shands, J.W., Jr., Fischlschweiger, W., and Small, P.A., Jr., (1980). Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to tracheal cells injured by influenza infection or by endotracheal intubation. *Infect. Immun.*, 27:614-619.

Ravel, J., and Cornelis, P. (2003). Genomics of pioverdine-mediated iron uptake in *Pseudomonads*. *Trends Microbiol.*, 11, 195-200.

Read,R.C.,Roberts, P., and Munro, N., (1992). Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J. Appl. Physiol.*, 72:2271-2277.

Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., and Haas, D., (1997). The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butiryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocinin, cyanide, and lipase. *Mol. Microbiol.*, 24:309-319.

Rust, L., Pesci, E.C., and Iglewski, B.H., (1996). Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) regulatory region. *J. Bacteriol.* 178:1134-1140.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Gold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Schimdhauser, T.J., and Helinsky, D.R. (1985). Region of broad-host-range plasmid RK2 involved in replication and stable maintenance in nine species of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 164:446-455.

Schmidt, K.D., Tümmler, B., and Römling, U. (1996). Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *Pseudomonas aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J. Bacteriol.*, 178, 85-93.

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

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

Soberón-Chávez, G., Lepine, F., and Déziel, E., (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biothechnol.*, 68:718-725.

Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Pees, E., and Lugtenberg B.J.J. (1987). Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarium* Sym plasmid pRL1JI. *Plant Mol. Biol.*, 9:27-39.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalk, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K.-S., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saler, M.H., Hancock, R.E.W., Lory, S., and Olson, M.V. (2000).

Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406:959-964.

Tamura, Y., Suzuki, S., and Sawada, T., (1992). Role of elastase as a virulence factor in experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Microbial Pathogen.*, 12: 237-244.

Tang, H.B., DiMango, E., Bryan, R., Gambello, M., Iglewski, B.H., Goldberg, J.B., and Prince, A., (1996). Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of neumonía in a neonatal mouse model of infection. *Infect. Immun.*, 64:37-43.

Terada, L.S., Johansen, K.A., Nowbar, S., Vasil, A.I., and Vasil, M.L., (1999). *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect. Immun.*, 67:2371-2376.

Traidej, M., Marquart, M.E., Caballero, A.R., Thibodeaux, B.A., and O'Callaghan, R.J., (2003). Identification of the active site residues of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV. Importance of enzyme activity in autoprocessing and activation. *J. Biol. Chem.*, 278:2549-2553.

Urban, A., Leipelt, M., Eggert, T., and Jaeger, K.E., (2001). DsbA and DsbC affect extracellular enzyme formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 183:587-596.

Vasil, M.L., and Ochsner, U., (1999). The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: Genetics, biochemistry and virulence. *Mol. Microbiol.*, 34:399-413.

Visca, P., Imperi, F., and Lamont, I.L., (2007). Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol.*, 15:22-30.

Wagner, V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I., and Iglewsky, B.H., (2003). Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of grow phase and environment. *J. Bacteriol.*, 185:2080-2095.

West, S.E.H., Schweizer, H.P., Dall, C., Sample, A.K., and Runyen-Janecky, L.J., (1994). Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 128:81-86.

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

Wick, M.J., Hamood, A.N., and Iglewsky, B.H., (1990). Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Mol. Microbiol.*, 4:527-535.

Winstanley, C., and Fothergill, J.L., (2008). The role of quorum sensing in chronic cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* infections. *FEMS Microbiol. Lett.*, 290:1-9.

Winzer, K., Falconer, C., Garber, N.C., Diggle, S.P., Camara, M., and 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.

Woese, C.R., Weisburg, W.G., Hahn, C.M., Paster, B.J., Zablen, L.B., Lewis, B.J., Macke, T.J., Ludwig, W., and Stackebrandt, E., (1985). The phylogeny of purple bacteria: the gamma subdivision. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6:25-33.

Yahr, T.L., Mende-Mueller, L.M., Friese, M.B., and Frank, D.W., (1997). Identification of type III secreted products of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J. Bacteriol.*, 179:7165.