



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**



**CARACTERIZACIÓN DE LA
REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL
GEN *rhIR* EN *Pseudomonas aeruginosa*
POR Vfr.**

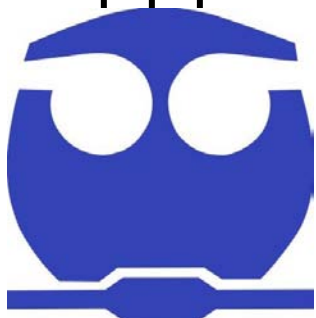
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

**P R E S E N T A:
GERARDO CRODA GARCIA**

Tutor: DRA. GLORIA SOBERÓN CHAVEZ

MEXICO, D.F. AGOSTO, 2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

La producción de muchos de los factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* que son responsables de la patogenicidad de esta bacteria se encuentran regulados a nivel de la transcripción por la Respuesta Sensora de Quórum (RSQ).

La RSQ depende de la producción, secreción, acumulación y detección de moléculas de señalización llamadas autoinductores (AIs). Determinando la concentración de los AIs *P. aeruginosa* es capaz de determinar si se encuentra en forma aislada o como parte de una población, mediante la RSQ *P. aeruginosa* puede modular su expresión génica en respuesta a la producción de los AIs, y tener una respuesta coordinada dependiente de la densidad celular.

En la RSQ de *P. aeruginosa* juegan un papel central las proteínas LasR y RhIR, unidas a sus correspondientes AIs 3-oxo-dodecanoil-homoserinlactona (3O-C₁₂-HSL) y butiral-homoserinlactona (C₄-HSL), respectivamente.

La RSQ en *P. aeruginosa* presenta una estructura jerárquica, ya que el complejo LasR/3-O-C₁₂-HSL activa la transcripción de *rhIR* y *rhII* (que codifica para la sintasa del autoinductor C₄-HSL) y a su vez el complejo RhIR/C₄-HSL activa la transcripción de los genes que codifican para los diferentes factores de virulencia, incluido el operón *rhIAB* que codifica para las enzimas responsables de la síntesis del biosurfactante ramnolípido. Este operón se encuentra justo río arriba de los genes *rhIR* y *rhII* en el cromosoma de *P. aeruginosa*.

Se ha demostrado que *rhIR* presenta cuatro sitios de inicio de la transcripción, de los cuales dos se encuentran en la región codificante de *rhIB*, y que la transcripción a través de estos cuatro promotores no sólo depende del complejo LasR/3-O-C₁₂-HSL. La proteína Vfr, que activa directamente la transcripción de *lasR*, previamente se había sugerido que podría afectar la transcripción de *rhIR*.

Los experimentos que se describen en esta tesis fueron desarrollados con la finalidad de entender la intrincada red de regulación que participa en la activación de la expresión de *rhIR*.

En este trabajo se estableció que la proteína Vfr regula directamente la transcripción *rhIR* a través de su unión a varias cajas vfr presentes en la región regulatoria de *rhIR*, una de las cuales tiene un efecto negativo en la transcripción (caja vfr4) y las cajas vfr3 y vfr1 activan la transcripción de este gen.

Adicionalmente en esta tesis se examinó el papel de la proteína LasR en la expresión de *rhIR*. Se encontró que la caja *las1* se sobrelapa con la caja vfr1, y que esta secuencia nucleotídica puede ser reconocida tanto por Vfr como por LasR, dando como resultado la activación de la expresión de *rhIR*. Adicionalmente se determinó que la proteína LasR puede activar la expresión de *rhIR* a través de la unión a la caja *las3*.

También en esta tesis se muestra que la transcripción de *rhIR* está sujeta a una autorregulación por retroalimentación positiva a través de la activación del promotor de *rhIA* por el complejo RhIR/C₄-HSL. Esta autorregulación positiva juega un papel importante en la expresión *rhIR* y por lo tanto en la RSQ de *P. aeruginosa*.

INDICE

| | Paginas |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| RESUMEN | 2 |
| LISTA DE FIGURAS | 7 |
| LISTA DE TABLAS | 9 |
| ABREVIATURAS | 10 |
| | |
| CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN. | 11 |
| 1.1 Introducción a los microorganismos | 11 |
| 1.2 Historia del descubrimiento y nombramiento de la bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 12 |
| 1.3 Características fisiológicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 12 |
| 1.4 Estructura del genoma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 | 13 |
| 1.4.1 Diversidad del genoma central de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . | 14 |
| 1.4.2 El Genoma accesorio de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 15 |
| 1.5 Patogénesis | 16 |
| 1.6 Factores de virulencia | 18 |
| 1.6.1 Factores de virulencia asociados a la célula | 18 |
| 1.6.11 Alginato | 19 |
| 1.6.12 Lipopolisacárido (LPS) | 20 |
| 1.6.13 Pili tipo IV | 21 |
| 1.6.14 Lectinas | 23 |
| 1.6.2 Extracelulares | 24 |
| 1.6.21 Ramnolípidos. | 25 |
| 1.6.22 Piocianina | 27 |
| 1.6.23 Proteasas | 29 |
| 1.6.23.1 Proteasa Alcalina | 29 |
| 1.6.23.2 Elastasas lasA y lasB | 30 |
| 1.6.23.3 Proteasa IV | 31 |
| 1.6.24 Cianuro | 31 |
| 1.6.25 Exotoxina A | 32 |
| 1.6.26 Factores de virulencia secretados por el sistema de secreción Tipo III | 33 |
| 1.7 Quorum sensing | 34 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.7.1 Quorum sensing en <i>P. aeruginosa</i> | 38 |
| CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES | 46 |
| CAPÍTULO 3. HIPOTESIS | 47 |
| CAPÍTULO 4. OBJETIVOS | 48 |
| 4.1 Objetivo General | 48 |
| 4.2 Objetivos Particulares | 48 |
| CAPÍTULO 5. MATERIALES Y METODOS | 49 |
| 5.1 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados | 49 |
| 5.2 Mantenimiento de cepas | 51 |
| 5.3 Medios de cultivo, antibióticos y suplementos utilizados | 51 |
| 5.4 Técnicas moleculares empleadas para manipular al DNA | 52 |
| 5.4.1 Reacciones de restricción | 52 |
| 5.4.2 Reacciones de ligación | 52 |
| 5.4.3 Purificación de DNA cromosomal | 53 |
| 5.4.4 Purificación de plásmidos | 53 |
| 5.4.5 Purificación de fragmentos de DNA | 54 |
| 5.5 Construcción de las cepas PAO1-WV y PAO1-V mediante transducción | 54 |
| 5.5.1 Transducción mediada por el bacteriófago E79tv-2 | 54 |
| 5.6 Análisis de la región regulatoria de <i>rhIR</i> . Búsqueda de cajas de unión de Vfr | 55 |
| 5.7 Construcción de fusiones reporteras | 55 |
| 5.8 Transformación | 59 |
| 5.9 Construcción de las cepas T001-003 | 60 |
| 5.10 Construcción de las cepas TGC001-03 mediante transducción | 61 |
| 5.10.1 Transducción mediada por el bacteriófago P1 _{vir} | 61 |
| 5.11 Condiciones de crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> y <i>P.aeruginosa</i> | 62 |
| 5.12 Ensayos de actividad de β -galactosidasa | 63 |
| 5.13 Ensayo de RT-PCR | 65 |
| 5.13.1 Extracción de RNA | 65 |
| 5.14 Síntesis del cDNA | 66 |
| 5.15 Reacción de PCR | 66 |
| CAPÍTULO 6. RESULTADOS | 68 |
| 6.1 Vfr activa directamente la transcripción <i>rhIR</i> | 68 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.2 Identificación de los sitios de unión para Vfr en la región regulatoria de <i>rhIR</i> | 69 |
| 6.3 Las secuencias de unión para LasR se sobrelapan con los VBS1 y VBS2 | 73 |
| 6.4 Efecto de la mutación de los VBS1 y VBS2 en la activación de <i>rhIR</i> por LasR/3O-C ₁₂ -HSL | 74 |
| 6.5 RhIR se autorregula positivamente a través de la expresión del promotor de <i>rhIA</i> | 78 |
| | |
| CAPÍTULO 7. DISCUSIÓN GENERAL | 80 |
| CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES | 85 |
| CAPÍTULO 9. PERSPECTIVAS | 85 |
| CAPÍTULO 10. REFERENCIAS | 86 |
| | |
| ANEXO. Transcriptional regulation of <i>Pseudomonas aeruginosa rhIR</i> : Role of the Crp-ortholog Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhIR | 96 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Representación circular del genoma de <i>P. aeruginosa</i> | 15 |
| Figura 2. Localización de los factores de virulencia en el cromosoma de <i>P. aeruginosa</i> y en los cromosomas de <i>V. cholerae</i> | 17 |
| Figura 3. Factores de Virulencia de <i>P.aeruginosa</i> | 18 |
| Figura 4. Estructura química del alginato | 19 |
| Figura 5. Representación de la pared celular | 21 |
| Figura 6. Representación del pili Tipo IV, su ensamblaje y retracción. | 22 |
| Figura 7. Estructura cristalográfica del sitio de unión de LecA con la galactosa (izquierda) y de LecB con la fucosa (derecha) | 24 |
| Figura 8. Estructura química del primer ramnolípido identificado | 25 |
| Figura 9. Ruta metabólica para la biosíntesis de mono y di-ramnolípido | 26 |
| Figura 10. Estructura química de piocianina. | 27 |
| Figura 11. Modelo de como permite la piocianina a <i>P.aeruginosa</i> mantener la homeostasis redox en condiciones de limitación de oxígeno. | 28 |
| Figura 12. Biosíntesis de ácido cianhídrico | 31 |
| Figura 13. Representación de la reacción catalizada por ExoA | 32 |
| Figura 14. Sistema de secreción tipo III | 33 |
| Figura 15. Biosíntesis de acil-homoserinlactonas por proteínas de la familia LuxI. | 36 |
| Figura 16. Mecanismo de bioluminiscencia en <i>V.fischeri</i> mediado por quorum sensing. | 37 |
| Figura 17. Sistemas de quorum sensing en <i>P. aeruginosa</i> | 38 |
| Figura 18. Factores de virulencia regulados de forma directa por Vfr e independientemente del sistema de quorum sensing | 44 |
| Figura 19. Sistemas de quorum sensing en <i>P. aeruginosa</i> | 44 |
| Figura 20. Mecanismo por el cual el regulador transcripcional Vfr puede estar regulando la transcripción de <i>rhIR</i> | 47 |
| Figura 21. Construcción de los plásmidos pGC2001-06 | 57 |
| Figura 22. Construcción de los plásmidos pGC2010-12 | 58 |
| Figura 23. Esquema que muestra la construcción de las fusiones transcripcionales que se encuentran en el cromosoma de la cepa TE2680 | 60 |
| Figura 24. Vfr activa la expresión de <i>rhIR</i> a través de la unión al VBS1 | 71 |
| Figura 25. Vfr reprime la expresión de <i>rhIR</i> a través de la unión al VBS4 | 72 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 26. Secuencia nucleotídica de la región regulatoria de <i>rhIR</i> | 73 |
| Figura 27. LasR activa la expresión de <i>rhIR</i> a través de la unión a los VBS1 y VBS3 | 74 |
| Figura 28. LasR no reprime la expresión de <i>rhIR</i> . | 77 |
| Figura 29. RhIR induce su propia expresión | 79 |
| Figura 30. <i>rhIR</i> forma un operón con los genes <i>rhIA</i> y <i>rhIB</i> | 79 |
| Figura 31. Esquema del mecanismo de regulación transcripcional del gen <i>rhIR</i> en <i>P.aeruginosa</i> | 84 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Ejemplos de factores de virulencia regulados por el sistema de quorum sensing. | 39 |
| Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio | 49 |
| Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo | 51 |
| Tabla 4. Antibióticos utilizados en los medios de cultivo | 52 |
| Tabla 5. Activación de la fusión transcripcional (<i>rhIR'-lacZ</i>) por Vfr | 69 |
| Tabla 6. Importancia de los VBS en la expresión de <i>rhIR</i> | 70 |
| Tabla 7. Importancia de las cajas <i>las</i> 1 y <i>las</i> 3 en la expresión de <i>rhIR</i> | 76 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| AI | Autoinductor |
| AHLs | Acil-homoserinlactonas |
| DL ₅₀ | Dosis Letal cincuenta |
| eEFII | Factor de Elongación Dos |
| ERO | Especies Reactivas de Oxígeno |
| FQ | Fibrosis Quística |
| GSH | Glutación |
| HCN | Acido cianhidrico |
| HAA | Ácido hidroxialcanoico |
| kDa | kiloDaltons |
| LB | Luria-Bertani |
| LPS | Lipopolisacárido |
| MDCK | Células de riñón caninas Madin-Darby |
| O ₂ | Oxígeno molecular |
| O ₂ ⁻ | Superóxido |
| ON | OverNight |
| PMN | Polimorfonucleares |
| QS | Quorum sensing |
| SAM | S-adenosilmetionina |

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción a los microorganismos

La vida en este planeta comenzó hace 4 mil millones de años con bacterias y probablemente estas serán los últimos seres vivos que habiten en él. Actualmente la mayoría de los seres vivos son bacterias, ya que se estima que existen 10^9 especies de bacterias en la tierra, desconocemos la mayor parte de ellas debido a que solo un número muy pequeño es cultivable y por lo tanto accesible para su análisis en el laboratorio.

Las bacterias, frecuentemente vistas como criaturas simples, han sido los organismos más exitosos en colonizar este planeta, ya que habitan en todos los nichos ecológicos existentes, que abarcan desde las aguas termales en el océano donde los hipertermófilos pueden crecer a $110\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta las regiones del ártico donde los psicrófilos habitan. Otras bacterias como *Deinococcus radiodurans* son altamente resistentes a las radiaciones.

Por otra parte desde el inicio de la investigación sobre las bacterias, esta ha sufrido un sesgo antropogénico ya que se consideran interesantes a aquellos organismos que ocasionan enfermedades al hombre o que pueden ser explotadas con propósitos industriales, como en el caso de los streptomycetos, que son las bacterias de las cuales se obtienen los antibióticos que han revolucionado la medicina, o aquellas bacterias que son benéficas para la agricultura como las bacterias del género *Rhizobium* que se utilizan como biofertilizantes o promotores del crecimiento de plantas [Martínez-Romero, 2001].

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ha sido extensamente estudiada debido a que representa para el hombre una amenaza a su salud y a su riqueza, y al mismo tiempo un área de oportunidad para mejorar su desarrollo tecnológico debido a que los ramnolípidos, un metabolito secundario de esta bacteria, tienen un gran potencial biotecnológico, porque se utilizan en la caracterización de superficies y recubrimientos, así como aditivos en la remediación de suelos contaminados y como agentes de control biológico [Martínez-Romero, 2001; Toribio *et al.*, 2010].

1.2 Historia del descubrimiento y nombramiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa fue aislada por primera vez de los apósitos, que tenían una coloración azul-verdosa por Carle Gessard en 1882, el describió a este organismo como sin color, globular, aeróbico y muy móvil, y le dio el nombre de *Bacillus pyocyaneus* [Gessard, 1882].

Posteriormente en 1894 el Profesor Migula inventó el género *Pseudomonas* al cual describió como bacilos estrictamente aeróbicos con flagelos polares y propuso como la especie tipo a *Pseudomonas pyocyanea* [Migula, 1894].

Algunos taxónomos sugieren que *Pseudomonas* es una derivación directa de la palabra griega mona o unidad por lo que *Pseudomonas* significaría: Falsa unidad. Aunque actualmente por rumores de personas que formaron parte del laboratorio del Profesor Migula, sugieren que él creó el término *Pseudomonas* por la similitud de estas células en tamaño y movilidad, con aquellas de los nanoflagelados llamados *monas*, por lo cual la intención de Migula fue llamar a estas bacterias “falsas *monas*” y no “falsas unidades”.

El nombre de *aeruginosa* proviene de la coloración que presentan las colonias de esta bacteria en ciertos medios de cultivo, el color se asemeja al óxido de cobre que es de una coloración verdosa. Lo que hizo el profesor Migula fue transferir el nombre de *P. pyocyanea* a *P. aeruginosa* [Palleroni, 2010].

1.3 Características fisiológicas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Clasificación Taxonómica

Reino: Bacteria, Phylum: Proteobacteria, Clase: Gammaproteobacteria, Orden: Pseudomonadales, Familia: Pseudomonadaceae, Género: *Pseudomonas* y Especie: *aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo, móvil, saprófito, ubicuo en la biósfera, que se puede encontrar en una gran variedad de ambientes naturales que incluyen ríos, pantanos, hábitats costeros y en el suelo donde puede colonizar a la fauna (ej: nemátodos) y flora endémica (ej: *O. sativa*), así como a ciertos hongos (ej: *Pythium*) y amibas (*D. discoideum*).

Por otro lado, también se puede aislar de aguas recreativas, residuales y contaminadas con gasolina o hidrocarburos aromáticos y en ambientes tan inhóspitos como son soluciones de clorhexidina y jabón [Pellett *et al.*, 1983; Pirnay *et al.*, 2005;

Khan *et al.*, 2007; Goldberg, 2000; Moore *et al.*, 2000; Lavenir *et al.*, 2008; Deziel *et al.*, 1996; Foght, 1996].

Debido a su gran versatilidad metabólica, en donde obtiene su energía principalmente a partir de un catabolismo oxidativo, en el cual puede utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía, entre los que se encuentran carbohidratos, ácidos grasos, ácidos dicarboxílicos, aminoácidos alifáticos, aromáticos, hidroxilados, aminas, hidroxiaácidos, alcanos, alcoholes alifáticos, compuestos aromáticos y en ciertos glicoles *P. aeruginosa* es capaz de colonizar los ambientes anteriormente mencionados [Stanier, 1966].

Por otro lado *P.aeruginosa* también puede crecer en un ambiente anaeróbico utilizando como aceptor de electrones al nitrato o sobrevivir utilizando la fermentación del piruvato o la arginina [Stanier, 1966; Suh *et al.*, 2002].

Las extraordinarias capacidades fisiológicas de *P.aeruginosa* mencionadas anteriormente le permiten a este organismo una exitosa adaptación a diversos nichos ecológicos. Al analizar el genoma de *P.aeruginosa* se encontró un gran número de genes involucrados en el transporte y catálisis de sustratos, lo que explica su capacidad de metabolizar una gran cantidad de compuestos orgánicos [Stover, 2000].

1.4 Estructura del genoma de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

P.aeruginosa presenta un único cromosoma circular cuyo tamaño varía entre 6 y 7Mb en las diferentes cepas secuenciadas, presenta un alto contenido de G + C (66.6%) y una capacidad codificante de aproximadamente 5500 genes que se encuentra en el mismo orden de complejidad que la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Fig.1).

Se sugiere que el gran contenido génico que presenta *P.aeruginosa* se debe al gran número de distintas familias génicas (grupos de parálogos), ya que solo se han encontrado algunos conjuntos de genes duplicados, por lo que la duplicación génica se descarta como el mecanismo responsable del gran tamaño de este genoma y por lo tanto de su versatilidad metabólica [Stover, 2000].

Dentro de las características particulares del genoma se encuentran:

El gran número de genes que codifican para reguladores transcripcionales y sistemas de dos componentes (521 genes) que son el 9.4% del total de genes, por lo que este organismo presenta una de las más altas proporciones de genes regulatorios observados en un genoma bacteriano (1 en 10) [Stover, 2000].

Basados en la comparación de los genomas de las diferentes cepas de *P.aeruginosa* se determinó que hay un genoma central que se encuentra altamente conservado y representa el 90% del total de las secuencias genómicas, y un genoma accesorio en el cual se encuentran diversos genes accesorios los cuales se encuentran asociados con islas e isletas genómicas.

Dentro de este genoma central se encuentran los genes de virulencia, con una conservación del 97% a nivel de la secuencia nucleotídica, esta gran conservación de los genes de virulencia independientemente de que la cepa aislada sea de origen clínico o ambiental sugiere que, todas las cepas de *P.aeruginosa* son potencialmente patógenas [Wolfgang, 2003].

1.4.1 Diversidad del genoma central de *Pseudomonas aeruginosa*

El genoma central se caracteriza por un alto grado de sintenia y una baja divergencia a nivel nucleotídico, aunque se han encontrado tres lugares de diversidad en el genoma central que son:

El gen *pilA* que codifica para la subunidad estructural del Pili tipo IV, es altamente polimórfico, debido a que en las cepas analizadas se han encontrado distintas clases de secuencias *pilA* que son más parecidas al pili de otras especies que entre ellas, ya que pueden tener valores de divergencia de hasta el 30% [Kiewitz, y Tümmler 2000].

El gen *fliC* que codifica para la flagelina, este es más conservado que el hipervariable gen *pilA*, y su diversidad genética solo se limita a unas cuantas sustituciones nucleotídicas y en el caso de las cepas ATCC 21776 y DSM 1128 a una región central que presenta hasta un 28% de divergencia a nivel nucleotídico [Kiewitz, y Tümmler 2000].

El locus de la pioverdina que es un quelante de hierro (III), en donde se han encontrado tres tipos de receptores en donde el receptor FpvA tipo I es el que domina en la población global, pero aislados clínicos de pacientes con el padecimiento fibrosis quística presenta los tres tipos de receptores FpvA con la misma frecuencia. Por lo cual el locus de la pioverdina es la región con la mayor divergencia en el genoma central de *P.aeruginosa* [Wiehlmann, 2007].

1.4.2 El genoma accesorio de *Pseudomonas aeruginosa*

Además de su genoma central *P. aeruginosa* presenta un genoma accesorio, que se encuentra frecuentemente asociado con islas o isletas de patogenicidad y profagos. El genoma accesorio se localiza en regiones discretas interdispersas a lo largo del genoma y es variable entre las diferentes cepas [Wolfgang, 2003; Klockgether, 2008].

Algunas de estas islas de patogenicidad incluyen genes que codifican para la maquinaria de glicosilación del flagelo, para la producción de exotoxinas como en el caso de ExoU, además de genes que están involucrados en la formación de biopelículas. De hecho estos genes cepa específicos tienen un porcentaje de G + C mucho más bajo que los genes del genoma central, lo que sugiere que estos genes fueron adquiridos recientemente [Brazas y Hancock 2005; Arora, 2005; Wolfgang, 2003].

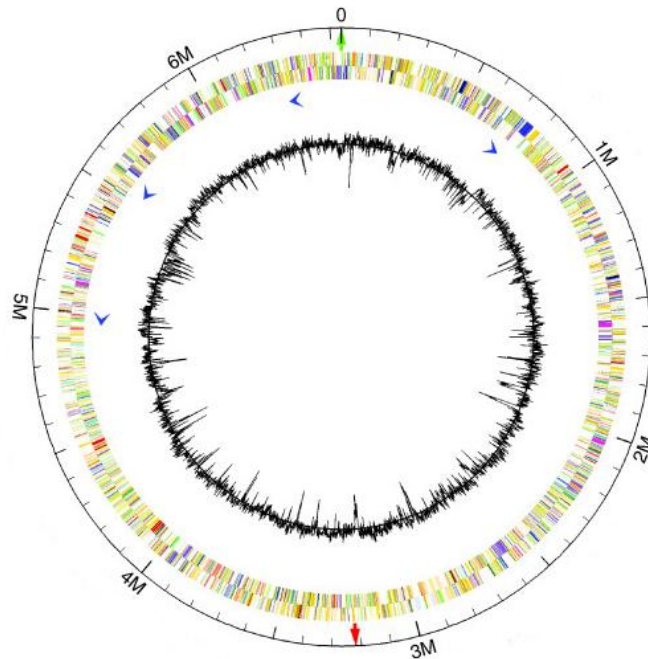


Figura 1. Representación circular del genoma de *P. aeruginosa*.

El círculo más externo representa la localización cromosomal, las marcas pequeñas y grandes representan incrementos de 100 y 500 Kbp respectivamente. El origen y el probable sitio de terminación de la replicación se indican con una flecha verde y una roja respectivamente. Las cabezas de flechas azules indican la posición y la orientación de los conglomerados de los genes que codifican para el RNA ribosomal. Los genes en la parte exterior del círculo intermedio son transcritos en la cadena positiva, y los genes en la parte interior del círculo intermedio son transcritos en la cadena negativa. El círculo más interno representa el porcentaje de GC.

1.5 Patogénesis

A diferencia de los llamados patógenos estrictos *P. aeruginosa* no posee las características genéticas específicas para superar al sistema inmunológico en organismos sanos y causar enfermedades en ellos, solo puede ocasionar enfermedades en individuos, en los cuales sus defensas naturales contra las infecciones bacterianas están disminuidas, por lo cual se le considera un patógeno oportunista.

P. aeruginosa representa un importante problema para los agricultores debido a que plantas que presenta un daño por heladas, o aquellas que se encuentran en condiciones de alta humedad, frecuentemente son colonizadas por esta bacteria ocasionando lesiones, como es en el caso de la lechuga, la albahaca, la planta de tabaco, la alfalfa y el pepino, por lo que deteriora sensiblemente la calidad de estos cultivos haciendo que estos no puedan ser comercializados [Elrod y Braun 1942].

Por otro lado *P. aeruginosa* representa un grave problema a los sistemas de salud del mundo debido a que es la bacteria Gram-negativa más frecuentemente encontrada en infecciones nosocomiales. Siendo responsable del 16% de los casos de neumonía nosocomial, del 12% de las enfermedades de vías urinarias adquiridas en hospitales, del 8% de las infecciones de heridas derivadas de una cirugía y del 10% de las infecciones del torrente circulatorio adquiridas en un hospital.

Pacientes inmunocomprometidos como aquellos con cáncer neutropénico o que recientemente han sido transplantados de medula ósea son altamente susceptibles a neumonías o septicemias ocasionadas por *P. aeruginosa*. En las unidades de atención a pacientes que presentan quemaduras, los brotes epidémicos de *P. aeruginosa* presentan niveles de mortandad de hasta el 60%. En las personas con SIDA la bacteriemia que ocasiona *P. aeruginosa* está asociada con el 50% de las muertes en estos pacientes. Las personas con el padecimiento llamado fibrosis quística (FQ) son especialmente susceptibles a ser colonizados en sus pulmones por *P. aeruginosa* lo que resulta en altos niveles de muerte en estas personas a una corta edad [Van Delden y Iglewski 1998].

Por lo cual esta bacteria representa un serio problema para los hospitales, ya que deterioran la calidad de vida de los pacientes y en el caso de los pacientes inmunocomprometidos a pesar de la gran cantidad de recursos humanos, técnicos y

económicos utilizados en mejorar su salud, el resultado final puede ser fatal debido a la injerencia de *P. aeruginosa*.

La capacidad de *P. aeruginosa* para producir una gran variedad de padecimientos en humanos, así como su capacidad para colonizar plantas, animales y nemátodos entre otros organismos, se debe al gran número y diversidad de factores de virulencia que presenta [Rahme, 2000] los cuales se encuentra dispersos en todo su genoma contrario a otros patógenos como *Vibrio cholerae* o *Yersinia pestis* en donde sus factores de virulencia se encuentran en regiones específicas de su genoma y su diversidad es limitada (Fig. 2). Además la patogenicidad de *P. aeruginosa* es multifactorial y combinatoria debido a que no está relacionada con un solo factor de virulencia sino a una combinación precisa entre los diferentes factores de virulencia para poder resultar en el fenotipo virulento [Lee, 2006; Yang 2008].

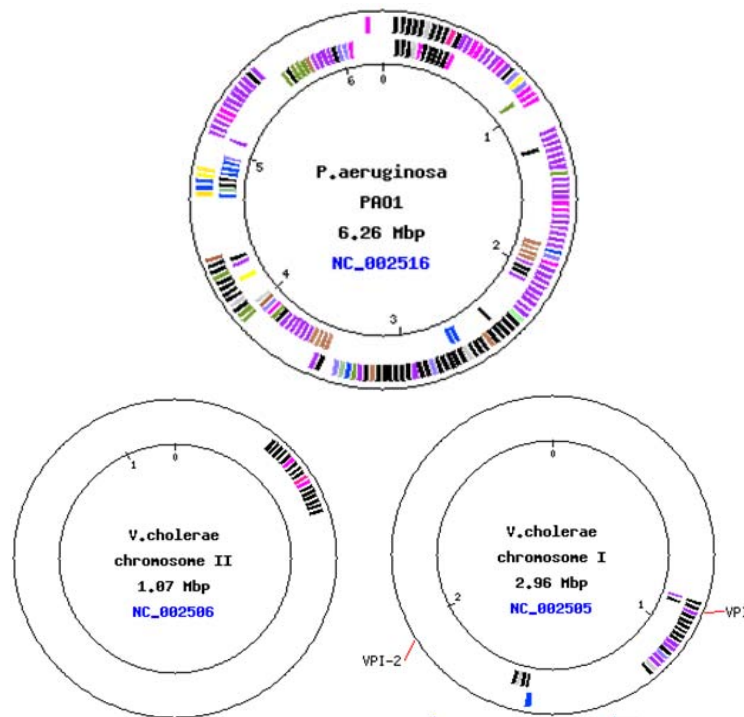


Figura 2. Localización de los factores de virulencia en el cromosoma de *P. aeruginosa* (parte superior) y en los cromosomas de *V. cholerae* (parte inferior).

Se sugiere que la capacidad de *P. aeruginosa* para causar infecciones en humanos es un efecto secundario de la capacidad que ha adquirido esta bacteria de utilizar como sus huéspedes naturales a nemátodos, plantas y amibas [Lee, 2006].

1.6. Factores de virulencia

Un factor de virulencia se refiere a las propiedades de un producto génico que permite a un microorganismo establecerse sobre o dentro de un huésped de una especie particular y tener el potencial de causar una enfermedad [Yang 2008].

Los factores de virulencia se pueden clasificar en dos grandes grupos, (Fig. 3) dependiendo de la relación física que guardan con la bacteria: asociados a la célula y extracelulares.

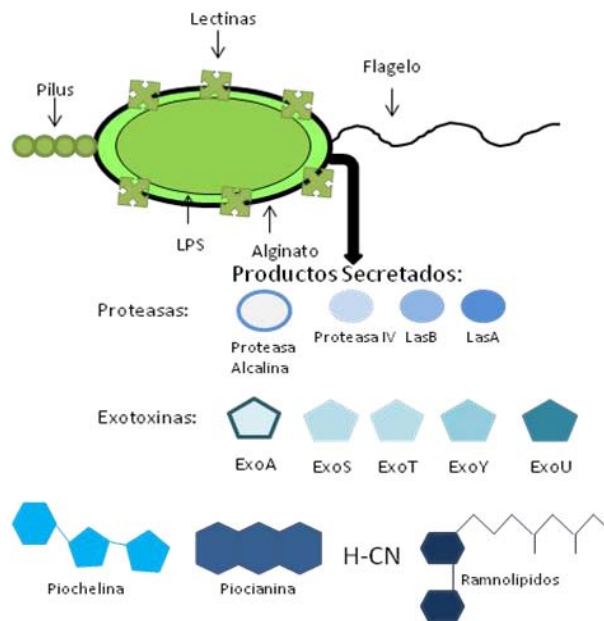


Figura 3. Factores de virulencia de *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* presenta tanto factores de virulencia asociados a la célula (flagelo, pilus, LPS, lectinas y alginato) como extracelulares.

1.6.1 Factores de virulencia asociados a la célula

Los factores de virulencia asociados a la célula entre los que se encuentran: el flagelo, los pili, el lipopolisacárido (LPS), las lectinas y el alginato se postula que son los responsables de la adhesión de *P. aeruginosa* a los epitelios y mucosas de su huésped, y permiten la posterior colonización de los tejidos del huésped.

1.6.11 Alginato

El alginato es un exopolisacárido lineal, de alto peso molecular, viscoso, que presenta carga negativa y está constituido por los monómeros: D-L-manuronato y su epímero del C5 el α -L-guluronato, los cuales se arreglan en forma homopolimérica (polimanuronato) o heteropolimérica, en donde los residuos de manuronato se encuentran acetilados en las posiciones O2 y O3 (Fig. 4) [Gacesa, 1998; Ramsey y Wozniak 2005].

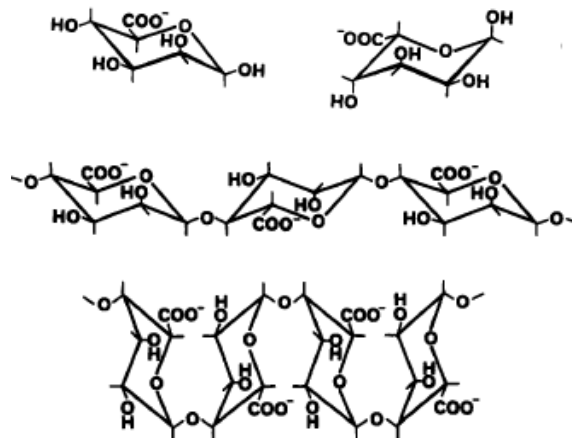


Figura 4. Estructura Química del Alginato.

Los ácidos urónicos: β -L-manuronato (parte superior izquierda) y su epímero α -L-guluronato (parte superior derecha), se ensamblan en bloques de polimanuronato (centro) o poliguluronato (parte inferior) o en secuencias mixtas para formar al alginato.

En la biosíntesis del alginato participan por lo menos 24 genes, los cuales están agrupados en el minuto 34 del cromosoma, se transcriben como un operón a partir del promotor de *algD*. Los genes *algA* y *algC* participan en la conversión de fructuosa-6-fosfato a GDP-manosa por lo cual también contribuyen a la biosíntesis del LPS, posteriormente la GDP-manosa es convertida por AlgD en GDP-manuronato el cual es polimerizado por Alg8 y transportado a través de la membrana interna por Alg44, después de la polimerización, algunos residuos de manuronato son epimerizados por AlgG, posterior a esta epimerización algunos residuos de manuronato son acetilados por el complejo proteico formado por AlgIJF y finalmente el copolímero es exportado al exterior de la célula por AlgE en donde lleva a cabo una diversidad de funciones entre las que se encuentran:

La adhesión a células epiteliales traqueales a través de interacciones mediadas por cargas, ya que esta unión es inhibida por polilisina. La formación y la estructuración de las biopelículas que como consecuencia de este tipo de crecimiento *P.aeruginosa* incrementa su resistencia contra los antibióticos convencionales [Gacesa, 1998; Ramsey y Wozniak 2005].

El alginato participa de una doble manera en la protección contra los neutrófilos: como barrera física y química contra las especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas por ellos, a la vez que suprime la atracción de los neutrófilos al sitio de la infección. Adicionalmente es capaz de impedir una correcta opsonización y por tanto la eliminación de *P.aeruginosa* por parte del sistema inmune [Ryder *et al.*, 2007; Pier, 2001; Ramsey y Wozniak 2005; Simpson *et al.*, 1989].

1.6.12 Lipopolisacárido (LPS)

También conocido como endotoxina está constituido por un lípido A hidrofóbico que ancla esta molécula a la membrana externa, el cual está constituido por un esqueleto de diglucosamina acilada difosfatada [4-*P*-β-D-GlcpNII-(1→6)-α-D-GlcpNI-(1→*P*)] con variación en el número de grupos acilos y de los tipos de sustituyentes de ácidos grasos. Unido al lípido A se encuentra el núcleo, el cual une al lípido A con el antígeno O, en donde el núcleo interno está formado por dos residuos de ácido D-mano-oct-2-ulosónico y dos residuos de L-glicero-D-manoheptosa mientras que el núcleo externo usualmente se sintetiza como dos glicofomas en la misma cepa, (Fig. 5) estas glicofomas contienen un residuo de galactosamina N-alanilada, tres residuos de D-glucosa y uno de L-ramnosa que difiere en su posición en las glicofomas. El antígeno O está constituido principalmente por ramnosa con diferentes azúcares N-acilados y es únicamente puede unirse a la glicofoma 2 [Pier, 2007].

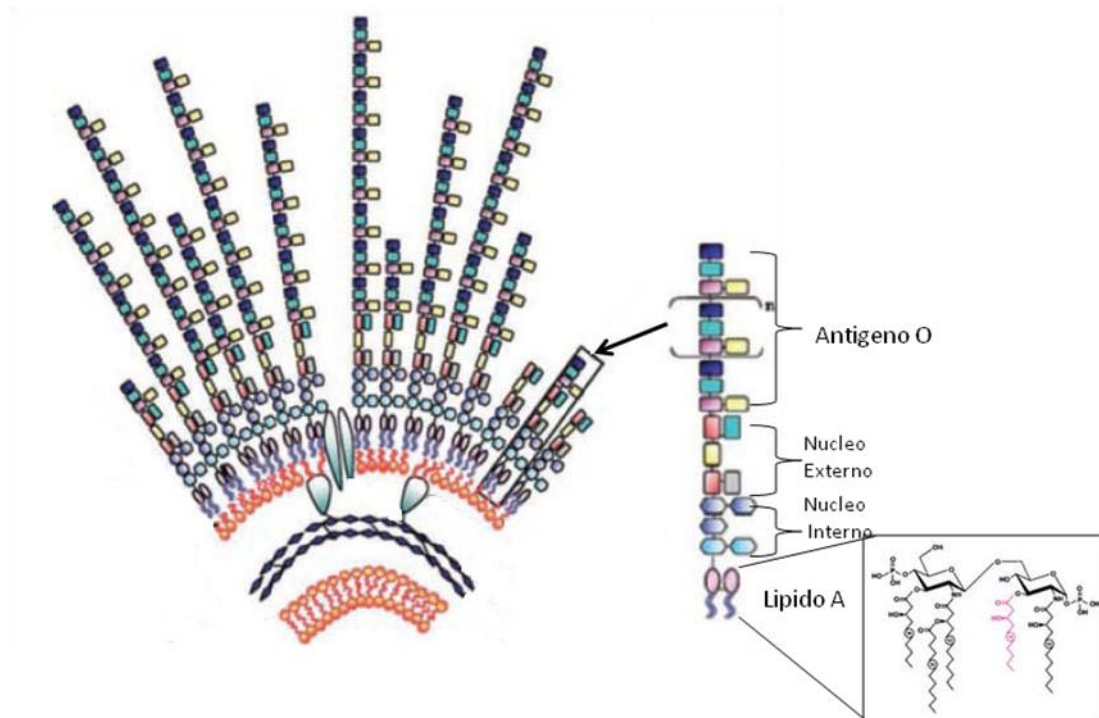


Figura 5. Representación de la pared celular. A la derecha en detalle se muestra la estructura del LPS.

Debido a que el LPS se encuentra en la pared celular este juega un importante papel en la interacción entre la célula y el ambiente que la rodea. Diferentes estudios han mostrado que un LPS que no presenta al antígeno O llamado “rugoso” es incapaz de producir una infección sistémica en el huésped, aunque siguen siendo virulentos para ocasionar una infección localizada. Por otro lado, utilizando como modelo de infección ratones que han sufrido quemaduras se observó que bacterias con LPS no rugoso necesitaban una Dosis Letal 50 (DL₅₀) de más de 1000 veces en comparación con la cepa silvestre, lo que comprueba que el antígeno O es fundamental para la virulencia de *P.aeruginosa* [Pier, 2007; Rocchetta *et al.*, 1999].

1.6.13 Pili tipo IV

Los pili son filamentos de aproximadamente 6 nm de diámetro y 5 micrómetros de largo que se localizan en uno de los polos de la célula. Se componen principalmente de una subunidad proteica llamada pilina (codificada por el gen *pilA*) (Fig. 6).

Esta proteína contiene un péptido señal (el cual es eliminado antes del ensamblaje de la pilina en el pilus), una región N-terminal hidrofóbica seguida por una región C-terminal de tipo globular que termina en una vuelta formada por un puente disulfuro [Burrows, 2005; Alm y Mattick 1997]. La estructura tridimensional de esta proteína muestra que la región N-terminal adopta una conformación de α -hélice, que forma el

núcleo del pilus, mientras que la región C-terminal consiste de 4 láminas beta antiparalelas empacadas sobre la α -hélice, que decoran la superficie del pilus [Keizer *et al.*, 2001; Craig *et al.*, 2003; Craig *et al.*, 2004].

Se postula que en el ensamblaje del pilus, las proteínas de membrana PilV, PilW y PilX, participan en la formación de la base de pilus, mientras que la proteína PilX funciona como el ancla del pilus [Alm y Mattick 1995].

En este proceso también se encuentra involucrada la proteína PilQ que forma un complejo dodecamérico, con forma de dona, en la membrana externa que permite el paso del pilus (Fig. 6) [Martin, 1995].

La evidencia que apoya la relación entre la formación del pilus y la forma celular es el hecho que la sobreexpresión del gen *fimV* produce células alargadas. Con base en el fenotipo de la sobreexpresión de FimV se ha postulado que esta proteína participa en la remodelación del peptidoglicano creando los conductos a través de los cuales se forma el complejo por medio del cual pasa el pilus [Semmler, 2000].

En la membrana externa además de PilQ, la lipoproteína PilP participa en la formación del conducto a través del cual pasa el pilus, mediante la estabilización del complejo formado por PilQ [Semmler, 2000].

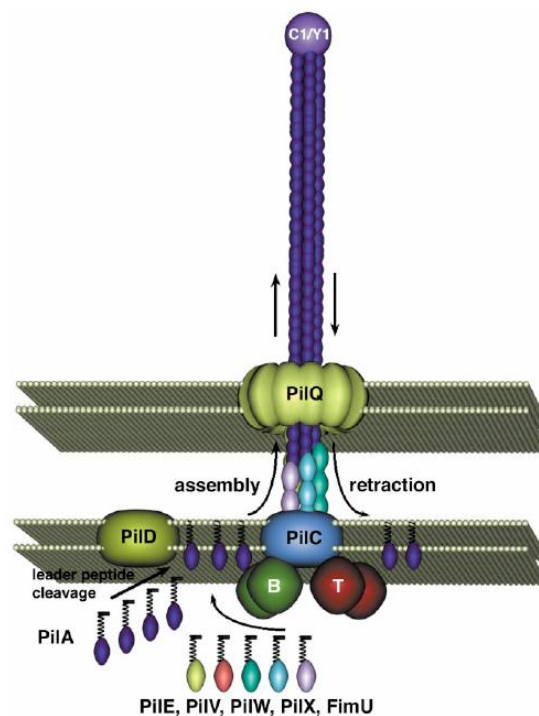


Figura 6. Representación del pili Tipo IV, su ensamblaje y retracción.

La secuencia líder de PilA es cortada por PilD, posteriormente la proteína PilA que ha sido procesada es ensamblada sobre la base que constituyen las pilinas menores (PilE, PilV, PilW y FimU), por la acción de las proteínas PilC y PilB. El pilus se extiende hacia el exterior atravesando la membrana externa a través del poro formado por el complejo multimérico de PilQ, estabilizado por la lipoproteína PilP. El pilus se retrae por la acción de PilT y se extiende por la acción de PilB. El pilus utiliza a PilC1/Y1 como adhesiva para su unión.

Los pili participan de forma activa en la adhesión de *P.aeruginosa* a sus células huésped. Esto se observó utilizando cultivos de células HeLa, epiteliales de humano 16HBE14, pneumocitos de pulmón A549 y células de riñón caninas Madin-Darby (MDCK), en donde mutantes incapaces de producir pili presentan una disminución en la unión a los tipos celulares anteriormente mencionados [Whitchurch *et al.*, 2004; Comolli *et al.*, 1999].

Para que se produzca la unión entre el pilus y las células epiteliales, es necesario un pilus funcional, debido a que mutantes incapaces de retraer el pilus, presentan una menor capacidad de unirse a su célula huésped con respecto a la cepa silvestre [Whitchurch *et al.*, 2004; Comolli *et al.*, 1999].

1.6.14 Lectinas

Las lectinas se definen como proteínas ubicuas que pueden unir carbohidratos de forma reversible y específica, por lo cual pueden producir la agregación de diferentes células y macromoléculas glicosiladas [Garber *et al.*, 1992].

P.aeruginosa produce dos lectinas LecA (PA-IL) y LecB (PA-IIL). LecA es una proteína compuesta por cuatro subunidades capaz de unirse a la D-galactosa y sus derivados (Fig. 7) [Gilboa-Garber, 1972].

Por otro lado LecB es capaz de unirse a L-fucosa y sus derivados, y a la D-manosa pero con una afinidad mucho menor (Fig. 7) [Glick y Garber 1983; Gilboa-Garber *et al.*, 2000].

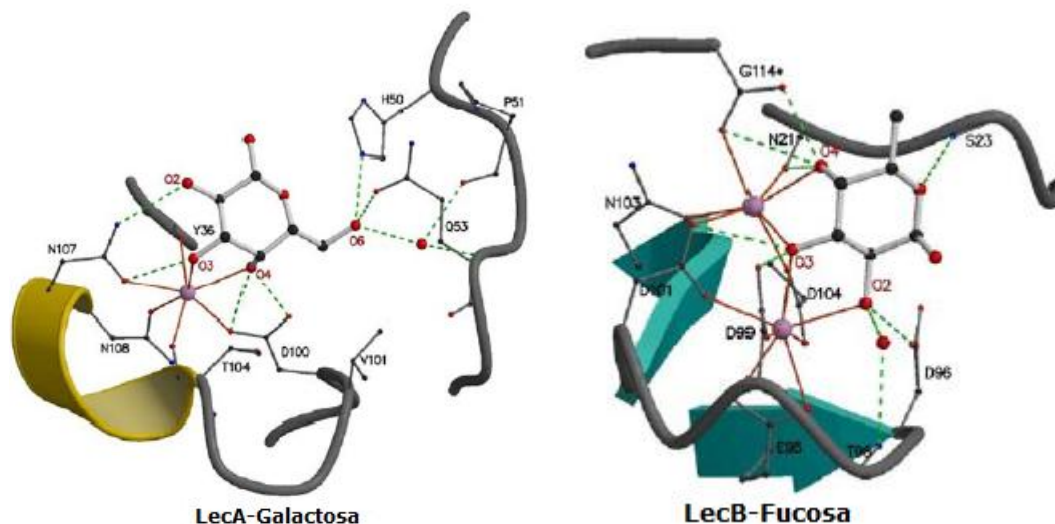


Figura 7. Estructura cristalográfica del sitio de unión de LecA con galactosa (izquierda) y de LecB con fucosa (derecha).

En rosa se muestra los átomos de calcio que participan en la unión del azúcar con la lectina, en naranja los enlaces covalentes coordinados del calcio, y en verde los puentes de hidrógeno. Los átomos de carbono se muestran en negro y los de oxígeno en rojo.

Las lectinas funcionan como adhesinas que permite a *P.aeruginosa* unirse a diferentes tejidos que presentan azúcares con un residuo terminal en α -galactosa: como los antígenos del grupo P de los eritrocitos (α -Gal-1,4-Gal), antígenos del grupo B eritrocitario que se han encontrado en la superficie de células endoteliales y en la superficie del epitelio [Sudakevitz, 1996].

Además de participar en la adherencia a las células, LecA produce un defecto en la permeabilidad del epitelio del intestino, lo que resulta en un incremento en la absorción de la Exotoxina A. Por otro lado LecB disminuye la frecuencia ciliar del epitelio de vías aéreas, por lo cual se disminuye un mecanismo de defensa del pulmón [Laughlin *et al.*, 2000; Adam *et al.*, 1997].

1.6.2 Factores de virulencia extracelulares

P. aeruginosa producen una diversidad de factores de virulencia extracelulares, los cuales causan un gran daño a los tejidos, y permiten la diseminación e invasión del torrente circulatorio en algunos casos. Los factores de virulencia que se mencionan a continuación forman parte de este grupo.

1.6.21 Ramnolípidos

Los ramnolípidos como su nombre lo indica están compuestos de moléculas de ramnosa (parte glúcida) y de cadenas lipídicas (parte aglúcida) unidas entre sí a través de un enlace O-glicosídico. La parte glúcida de la molécula está compuesta por una (mono-ramnolípido) o moléculas de ramnosa dos (di-ramnolípido) unidas entre sí por un enlace glucosídico α -1,2. La parte aglúcida está constituida principalmente de una o dos cadenas de ácidos grasos β -hidroxilados (que varían en su longitud entre 8 y 16 carbonos) unidos entre sí por un enlace de tipo ester (Fig. 8). En la mayoría de los casos, el grupo carboxilo del ácido graso hidroxilado distal, con respecto a la molécula de ramnosa permanece libre [Abdel-Mawgoud, 2010].

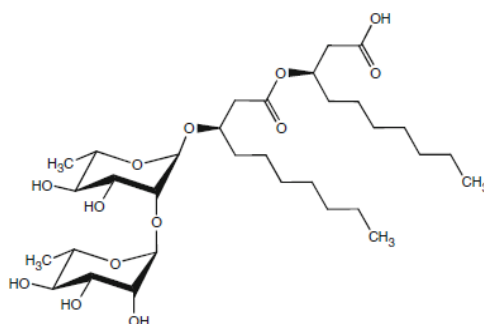


Figura 8. Estructura química del primer ramnolípido identificado, simplemente denominado α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato.

La producción de los ramnolípidos en *P.aeruginosa* depende de las vías del metabolismo primario como son la síntesis de ácidos grasos y la de los azúcares activados por dTDP. La síntesis de la parte glúcida de los ramnolípidos, presenta varios pasos en común con la producción del LPS y del alginato (Fig. 9) [Toribio *et al.*, 2010].

Los ramnolípidos son sintetizados a través de 3 reacciones secuenciales. La primera es catalizada por la enzima RhIA, que participa en la síntesis de los ácidos 3-(3-hidroxi- ω -alcanoiloxi) alcanoicos (HAA). La segunda reacción es catalizada por RhIB que acopla al azúcar que se encuentra activado (dTDP-L-ramnosa) al dímero del 3-hidroxiácido graso (producido por RhIA) para formar al monoramnolípido, primordialmente ramnosa-C10-C10. El monoramnolípido producido junto con la dTDP-L-ramnosa son los sustratos de RhIC que sintetiza al di-ramnolípido [Toribio *et al.*, 2010].

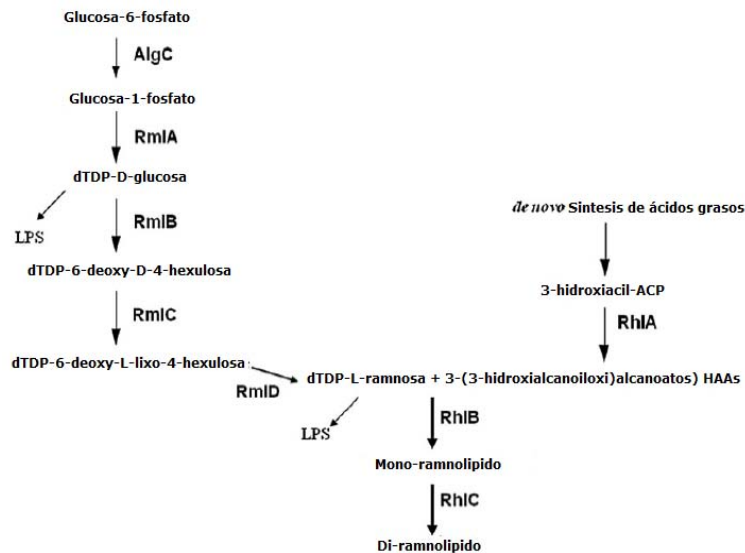


Figura 9. Ruta metabólica para la biosíntesis de mono y di-ramnolípidos.

En *P. aeruginosa* los ramnolípidos son utilizados como hemolisinas contra los eritrocitos así como contra tipos celulares fagocíticos y no fagocíticos [Häussler *et al.*, 1998].

Se encontró que la concentración de los ramnolípidos en el esputo de pacientes con FQ está directamente relacionada con el empeoramiento del estado clínico del paciente, debido a que los ramnolípidos inducen la actividad quimiotáctica de los PMN y posteriormente su lisis, además del ataque oxidativo mediado por monocitos, la producción de histamina por los mastocitos, la liberación de los mediadores de la inflamación serotonina y la producción de los ácidos 12-hidroxi-eicosatetraenoicos de las plaquetas, por lo cual los ramnolípidos probablemente contribuyen al daño inflamatorio observado en los pulmones de los pacientes con FQ [Abdel-Mawgoud, 2010].

Adicionalmente al efecto observado en pacientes con FQ, en pacientes sin este padecimiento, los ramnolípidos inhiben la eliminación mecánica de esta bacteria en el pulmón, ya que son los responsables de inhibir la función ciliar en el epitelio. Finalmente la importancia de los ramnolípidos en el establecimiento de las infecciones se demostró con un modelos de infección pulmonar en ratón, en donde una cepa mutante en el gen *rhlA* se eliminaba más fácilmente que la cepa silvestre [Kanthakumar *et al.*, 1996; Somerville *et al.*, 1992; Van Gennip *et al.*, 2009].

Los ramnolípidos adicionalmente le proporcionan a *P. aeruginosa* una ventaja competitiva debido a que presentan una actividad antimicrobiana, contra

prácticamente todas las bacterias Gram-positivas probadas y también contra las bacterias Gram-negativas *S. marcescens*, *E. aerogenes*, y *K. pneumoniae*.

El blanco dentro de estas bacterias es la envoltura celular, donde se propone que el mecanismo de acción de los ramnolípidos consiste en el intercalamiento en las membranas biológicas y su destrucción por un efecto de permeabilización [Sotirova *et al.*, 2008].

Lo que junto con el hecho de que los ramnolípidos pueden solubilizar a los alcanos de cadena larga, a la vez que ocasiona que la superficie celular de *P.aeruginosa* se vuelva más hidrofóbica para facilitar su asimilación dentro de la bacteria, confirma la importancia de los ramnolípidos para la competitividad de la bacteria en sus hábitats naturales así como para su capacidad de sobrevivencia dentro del huésped [Hommel, 1994; Al-Tahhan *et al.*, 2000].

1.6.22 Píocianina

La N-metil-1-hidroxi-fenazina comúnmente llamada píocianina (Fig.10), es un pigmento azul con un potencial redox estándar de $E_o' = -34$ mV, que le proporciona a *P.aeruginosa* su color característico azul-verdoso [Friedheim y Michaelis 1931].

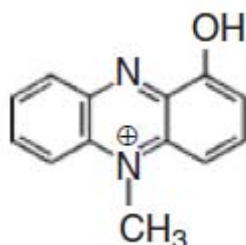


Figura 10. Estructura química de la N-metil-1-hidroxi-fenazina comúnmente conocida como píocianina.

Debido a su potencial redox, la píocianina es capaz de tomar electrones del NAD(P)H $E_o' = -320$ mV y del glutatión (GSH) $E_o' = -240$ mV, ocasionando su oxidación y al mismo tiempo la reducción de la píocianina. La píocianina reducida puede reaccionar con el oxígeno molecular (O_2) para formar el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) y otras especies reactivas de oxígeno [Muller, 2002].

La píocianina le permite a *P.aeruginosa* mantener la homeostasis redox en condiciones de limitación de oxígeno, debido a que la reoxidación del NADH se acopla a la reducción de la píocianina, probablemente a través de una reductasa de la

piocianina y los electrones pueden ser transferidos de la piocianina al oxígeno a través de una reacción abiótica.

Otro mecanismo con el cual la piocianina evitaría la acumulación de NADH sería a través de la secreción de piruvato al medio extracelular antes de que entre al ciclo de Krebs y produzca NADH (Fig. 11) [Price-Whelan *et al.*, 2007].

Adicionalmente se propone que en *P. aeruginosa* la piocianina funciona como la molécula terminal de la cascada de QS induciendo la expresión de los genes *mexGHI-opmD* y PA2274 que previamente se había encontrado que estaban bajo el control del sistema de QS [Dietrich *et al.*, 2006].

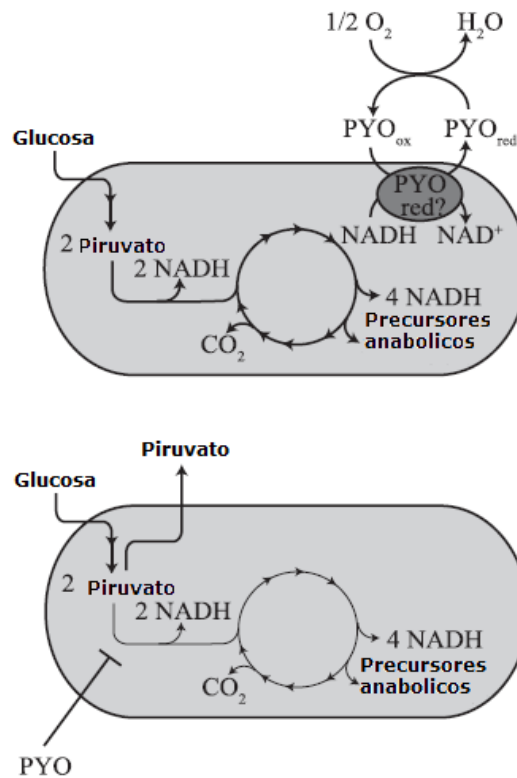


Figura 11. Modelo de como la piocianina permite a *P.aeruginosa* mantener la homeostasis redox en condiciones de limitación de oxígeno. En la parte superior de la figura se muestra que la piocianina mantendría la homeostasis a través de la oxidación del NADH. En la parte inferior el mecanismo que se propone es que la piocianina inhibe a la piruvato deshidrogenasa con lo cual se evitaría la reducción del NAD⁺ y la formación del NADH.

Por otro lado la piocianina presenta múltiples propiedades deletéreas contra huéspedes eucariontes, ya que después de que atraviesa la membrana celular

comienza a disminuir la concentración intracelular de glutatión modificando el balance redox [Muller, 2002].

Al mismo tiempo se encuentra produciendo a las ERO: superóxido y peróxido de hidrógeno, las cuales son las responsables de muchos de los efectos deletéreos de la piocianina contra su huésped eucarionte entre los que se encuentran: la modulación del sistema inmune, ya que produce el incremento de la IL-8 que es la responsable de la quimioatracción de los PMN y de el daño colateral que ellos causan en las vías respiratorias, la apoptosis de los PMN, la inhibición de la respiración celular, la función ciliar y del sistema Duox que es el responsable de la producción de las ERO responsables de la eliminación de *P.aeruginosa* [Rada y. Leto 2009; Denning *et al.*, 1998].

1.6.23 Proteasas

Las proteasas también conocidas como proteinasas son un grupo de enzimas hidrolíticas que catalizan la ruptura de varios enlaces peptídicos en las proteínas. Las proteasas están involucradas en la digestión de cadenas polipeptídicas en fragmentos más cortos, quitando aminoácidos de la cadena peptídica mediante el ataque de un enlace peptídico interno en la proteína.

A la fecha se conocen cuatro tipos de proteasas que son secretadas por *P. aeruginosa*; (i) elastasa LasB, (ii) elastasa LasA o estafilolisina, (iii) proteasa alcalina y (iv) proteasa IV. Estas proteasas están asociadas con la virulencia de *P. aeruginosa* debido a que incrementan su habilidad para invadir tejidos.

1.6.23.1 Proteasa alcalina

La proteasa alcalina es una metaloproteasa dependiente de zinc que presenta dos dominios estructurales. El dominio globular abarca a los residuos 18-251 y es el dominio que presenta la actividad proteolítica y une al átomo de zinc a través de las histidinas 176, 180 y 186 en donde se postula que la Glu 177 es el residuo catalítico. El dominio C-terminal abarca los residuos 252-470 y está formado por 12 láminas beta que forman un dominio sándwich de dos capas [Baumann *et al.*, 1993].

Si bien el rol de la proteasa alcalina aún no es muy claro, debido a que no se conoce con exactitud cuales son sus sustratos específicos, hay evidencia que juega un papel durante el desarrollo de infecciones en la cornea ya que utilizando un modelo animal

se reportó que mutantes deficientes en la producción de la proteasa alcalina eran incapaces de ocasionar daño a la córnea [Howe y Iglewski 1984].

1.6.23.2 Elastasas lasA y lasB

La elastasa es una metaloendopeptidasa dependiente de zinc que está codificada por el gen *lasB*, la cual es sintetizada como una preproenzima que consiste de: un péptido señal de 23 aminoácidos, un propéptido de 174 residuos y un dominio catalítico carboxi terminal formado por 301 residuos. El péptido señal de la elastasa es removido durante el paso de la elastasa de la membrana interna al periplasma, posteriormente en este compartimiento celular el propéptido es auto procesado y por último la elastasa es secretada al medio extracelular unida con su propéptido de forma no covalente [Kessler *et al.*, 1998].

La elastasa tiene un papel preponderante en la infección por *P. aeruginosa* debido a que degrada la elastina, proteína que se encuentra en gran cantidad en los tejidos del ser humano y que les confiere elasticidad; en el pulmón permite los movimientos de expansión-contracción, al igual que en los vasos sanguíneos.

Además, la elastasa es capaz de reducir la respuesta del sistema inmunológico para eliminar a *P.aeruginosa* porque degrada factores del complemento, citocinas, el péptido antibacterial LL-37, la α -defensina e inhibe la quimiotaxis de los neutrófilos polimorfonucleares y la elastasa que ellos producen [Schmidtchen *et al.*, 2003].

La proteasa LasA es una metaloendopeptidasa dependiente de zinc que está codificada por el gen *lasA*, la cual es sintetizada como una preproenzima, con un propéptido inusualmente largo en su extremo amino terminal de 22 kDa, el cual es mucho mayor que el dominio activo. LasA es secretada al medio extracelular en donde es procesada a su forma activa por LasB [Kessler, 1995; Gustin *et al.*, 1996].

Su principal aportación como factor de virulencia resulta del corte que hace en los entrecruzamiento pentaglicínicos del peptidoglicano de la pared celular [Morihara, 1995].

1.6.23.3 Proteasa IV

Es una serín-proteasa, cuya función principal es la de degradar los componentes del complemento C1q y C3, la inmunoglobulina G, así como al fibrinógeno, plasmina y plasminógeno [Engel *et al.*, 1998].

Como en otras proteasas de *P.aeruginosa* en la proteasa IV la autodigestión juega un papel importante en la maduración de ésta. Este factor de virulencia es importante en infecciones de córnea, debido a que mutantes de *P.aeruginosa* en la proteasa IV presentan una menor virulencia [Traidej *et al.*, 2003; Engel *et al.*, 1997].

1.6.24 Cianuro

En condiciones fisiológicas el cianuro se encuentra principalmente como ácido cianhídrico (HCN), concentraciones micromolares de este compuesto son capaces de inhibir a la citocromo c oxidasa, que es un componente fundamental de la cadena de respiratoria, y a otras metaloenzimas como la: catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa, nitrato reductasa y nitrito reductasa ocasionando la muerte celular y favoreciendo la diseminación tisular. Debido a que es el factor responsable de la muerte del nemátodo *C. elegans* se postula que el HCN es utilizado por *P.aeruginosa* para evitar ser devorada por depredadores eucariontes [Blumer y Haas, 2000].

El cianuro es producido por la HCN sintasa que se encuentra unida a la membrana y es sensible al oxígeno, la cual utiliza a la glicina como sustrato, en donde la convierte en HCN y CO₂ (Fig. 12) [Blumer y Haas, 2000].

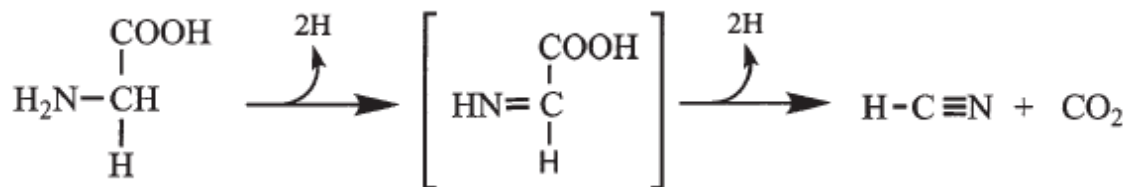


Figura 12. Biosíntesis de ácido cianhídrico.

El HCN es sintetizado a partir del aminoácido glicina por descarboxilación oxidativa formándose como intermediario altamente inestable un iminoácido, la enzima responsable de llevar a cabo la reacción enzimática es la HCN sintasa codificada por los genes *hcnABC*.

1.6.25 Exotoxina A.

Frecuentemente se refiere como el factor de virulencia más potente de este organismo, teniendo una DL_{50} de $0.2 \mu\text{g}/\text{animal}$ cuando es inyectada intraperitonealmente en el ratón [Wick, 1990].

Se clasifica como una toxina de ribosilación del factor de elongación 2 (en esta misma clasificación se encuentra la toxina de la difteria). La Exotoxina A se sintetiza como un precursor de 638 aminoácidos, con un péptido señal de 25 aminoácidos en su extremo N-terminal, el cual es eliminado una vez que la proteína madura es excretada al medio extracelular [Barth *et al.*, 1998].

La exotoxina A cataliza la transferencia de la ADP-ribosa del NAD al factor de elongación dos (eEFII), al residuo de histidina modificado posttranscripcionalmente llamado diftamida, lo que detiene la síntesis de proteínas al nivel de la elongación de la traducción (Fig. 13), lo que ocasiona la muerte celular y facilita la diseminación bacteriana a través de los tejidos dañados [Beattie *et al.*, 1996a; Beattie *et al.*, 1996b.]

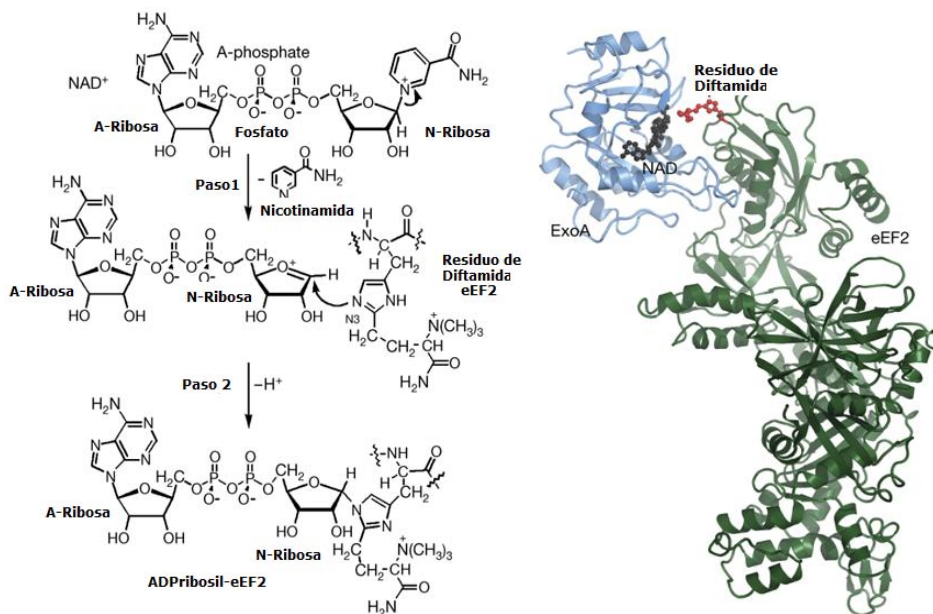


Figura 13. Representación de la reacción catalizada por ExoA.

A la izquierda se muestra la transferencia de la A-ribosa del NAD⁺ al nitrógeno 3 del imidazol de la diftamida, causando la anulación de la función de eEFII y por lo tanto de la síntesis de proteínas. Del lado

derecho se muestra el complejo eEF2-ExoA-NAD⁺. ExoA se encuentra interaccionando con el dominio de eEFII que presenta el residuo de diftamida que apunta en dirección del NAD⁺. Abreviaciones A-Ribosa: ADP-ribosa, N-Ribosa: Nicotinamida ribosa.

1.6.26 Factores de virulencia secretados por el sistema de secreción Tipo III.

P. aeruginosa presentan cuatro exotoxinas ExoS, ExoT, ExoU y ExoY que son introducidas dentro del citoplasma de las células huésped a través del sistema de secreción tipo III (Fig. 14). Estas exotoxinas permiten a la bacteria evadir la respuesta inmune, además de superar barreras físicas para lograr su replicación y diseminación dentro del huésped, es importante mencionar que para que estas exotoxinas sean activas es necesario un cofactor que se encuentra únicamente en el huésped. *P. aeruginosa* utiliza este mecanismo para protegerse de los efectos deletereos de sus propias exotoxinas [Engel y Balachandran 2009].

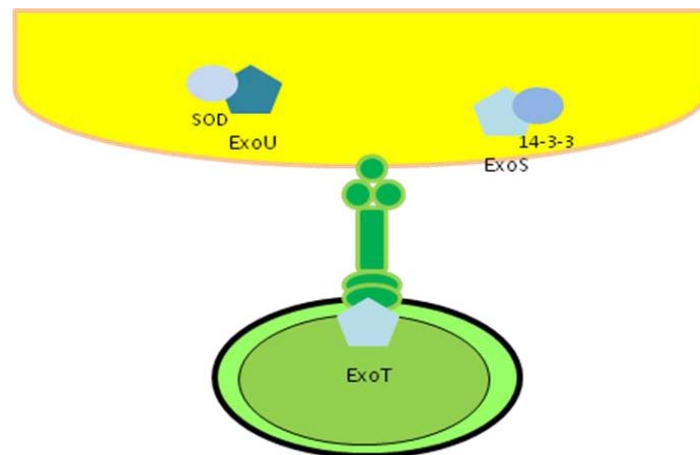


Figura 14. Sistema de secreción tipo III.

Después de contactar a la célula huésped el sistema de secreción tipo III es activado, y las exotoxinas son inyectadas en la célula, donde originalmente se localizarán en la membrana. En un cierto punto cada una de las exotoxinas interaccionarán con su cofactor y subsecuentemente modificarán a sus sustratos dentro del huésped.

1.7 Quorum sensing

La frase “La unión hace la fuerza” ha sido utilizada para demostrar la importancia del trabajo en equipo y esto fue notado por Smith en 1905 con respecto a las bacterias cuando introdujo el siguiente pensamiento: “Yo pienso que muchas bacterias son más fuertes que pocas, por lo cual uniéndose muchas pueden superar obstáculos que son demasiado grandes para unas pocas” [Williams *et al.*, 2007].

Las bacterias como se mencionó previamente secretan una gran variedad de pequeñas moléculas, entre las cuáles se encuentran antibióticos, sideróforos, productos finales del metabolismo así como feromonas también llamadas autoinductores los cuales se consideran que proveen a las bacterias un mecanismo para determinar su número. En 1994 Fuqua introdujo el término Quorum Sensing (QS) para describir este mecanismo por el cual las bacterias determinan su tamaño poblacional [Williams *et al.*, 2007].

El término QS también se utiliza para describir la habilidad de un microorganismo para censar una señal intracelular que el mismo produce llamada autoinductor e iniciar una respuesta específica. Entre las características de un autoinductor se encuentran: a) La producción del autoinductor solo se lleva a cabo durante una etapa específica de crecimiento, bajo ciertas condiciones fisiológicas o en respuesta a cambios ambientales. b) El autoinductor se debe acumular en el medio extracelular y ser reconocido por un receptor específico en la bacteria. c) La acumulación del autoinductor debe alcanzar una concentración umbral para generar una respuesta concertada [Ng y Bassler 2009].

El QS permite a una bacteria cambiar entre dos programas de expresión génica: Uno que es favorecido a baja densidad celular para comportamiento individual y asocial, y otro que es favorecido a altas densidades celulares para comportamiento de grupo y social [Ng y Bassler 2009].

Los pasos fundamentales en la detección y respuesta a las fluctuaciones en el número celular son los siguientes:

Los autoinductores que son moléculas de bajo peso molecular son sintetizados intracelularmente posteriormente son liberados de forma pasiva o activamente al exterior de la célula, (la concentración de los autoinductores se incrementa de forma proporcional al número de células de la población) y por último cuando los autoinductores superan la concentración umbral requerida para su detección, sus

receptores cognado los reconocen y desatan cambios en la expresión genética a nivel de la población. Por lo cual el QS permite a las células de una población funcionar en forma coordinada [Ng y Bassler 2009].

Las acil-homoserinlactonas (AHLs) son la principal clase de autoinductores utilizados por las Proteobacterias para la comunicación intraespecie. Los cuales se componen de un anillo homoserin-lactónico con una cadena acílica que varía en su longitud entre 4 y 18 carbonos, que ocasionalmente presenta una modificación en el carbono 3 [Fuqua *et al.*, 2001].

El primer autoinductor y su circuito regulatorio fueron descubiertos en la bacteria marina *Vibrio fischeri* la cual coloniza al órgano luminoso del calamar *Euprymna scolopes*. Debido al ambiente rico en nutrientes dentro del órgano luminoso del calamar, *V.fischeri* crece hasta alcanzar altas densidades celulares, en estas condiciones utiliza al sistema de QS para activar al operón de la luciferasa que es el responsable de la producción de luz. El calamar utiliza a las bacterias productoras de luz para iluminarse en una estrategia antidepredadora [Ruby,1996].

Los componentes centrales del sistema de QS que controlan la bioluminiscencia en *V.fischeri* son las proteínas LuxI y LuxR, en donde LuxI es la sintasa del autoinductor *N*-3-oxo-hexanoil-homoserin lactona (3-O-C₆-HSL) [Engebrecht *et al.*,1984; Schaefer *et al.*, 1996].

La proteína LuxI utiliza a la *S*-adenosilmetionina (SAM) como sustrato para formar al anillo homoserin-lactónico y al hexanoil-ACP como la fuente de la cadena lateral acilo (Fig. 15). Después de su síntesis la 3-O-C₆-HSL difunde libremente dentro y fuera de la célula, y su concentración va aumentando de forma proporcional al incremento en el tamaño de la población [More, 1996; Schaefer *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 1985].

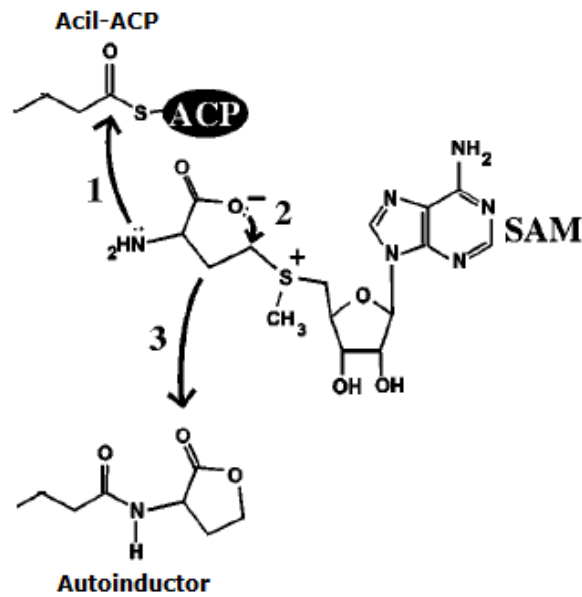


Figura 15. Biosíntesis de acil-homoserinlactonas por proteínas de la familia LuxI.

Las proteínas de la familia LuxI utilizan S-adenosilmetionina (SAM) y una proteína específica acarreadora de acilos (acil-ACP) como sustratos para la biosíntesis de los autoinductores. La proteína de la familia LuxI facilita la formación de un enlace amida entre el SAM y la cadena acilo de la acil-ACP (Paso 1), Posteriormente ocurre la lactonización del intermediario que presenta el enlace amida (Paso 2) que finalmente resulta en la formación de la acil-homoserinlactona (Paso 3). En la figura se muestra la síntesis del autoinductor butanoil-homoserinlactona el cual es sintetizado por la proteína RhII de *P.aeruginosa*.

El receptor citoplásmico para la 3-O-C₆-HSL es la proteína LuxR, que presenta en la región carboxi-terminal al dominio responsable de la unión a su secuencia blanco en el DNA cromosomal y otro dominio en el extremo amino-terminal (que comprende dos-terceras partes de la proteína) donde se une el autoinductor y es el responsable de la oligomerización de esta proteína [Fuqua *et al.*, 1994]. La especificidad de unión entre LuxR y 3-O-C₆-HSL es alta y existe evidencia de que esta interacción de la proteína regulatoria con el autoinductor induce la oligomerización del regulador transcripcional [Kiratisin *et al.*, 2002; Lamb *et al.*, 2003].

Por otro lado la proteína LuxR en ausencia de 3-O-C₆-HSL es inestable y se degrada rápidamente, pero cuando la 3-O-C₆-HSL se acumula superando su concentración umbral es capaz de unirse a LuxR, y el complejo LuxR-3-O-C₆-HSL reconoce a su secuencia de unión en la región promotora del operón *luxICDABE* (Fig. 16), la cual se conoce como caja *lux* y presenta la siguiente secuencia consenso: N₃-TGT-N₉-CAG-N₃ [Stevens *et al.*, 1994].

Debido a que la expresión de *luxI* es inducida por LuxR-3-O-C₆HSL, la producción del autoinductor se incrementa y el ambiente aledaño es inundado con el autoinductor. Se postula que esta retroalimentación positiva es la responsable del cambio del modo de comportamiento de baja densidad al de alta densidad celular.

El sistema LuxR/LuxI se encuentra ampliamente distribuido en las bacterias Gram-negativas y es considerado el paradigma para el control de la expresión por QS [Ng y Bassler 2009].

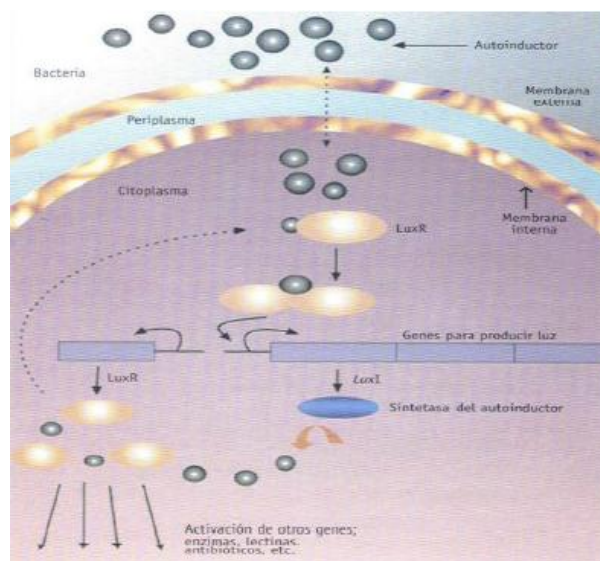


Figura 16. Mecanismo de bioluminiscencia en *V.fischeri* mediado por quorum sensing.

Superada la concentración umbral del autoinductor, este se une a la proteína LuxR, y el complejo LuxR-3-O-C₆-HSL reconoce a la caja *lux* ubicada en el promotor del operón *luxICDABE*, activando su transcripción y por lo tanto aumentado la concentración de la luciferasa que es la enzima responsable de la producción de luz.

1.7.1 Quorum Sensing en *P.aeruginosa*.

P.aeruginosa utiliza tres diferentes sistemas de señalización célula-célula (QS) para controlar la expresión de una parte de su repertorio génico (Fig. 17).

El núcleo del sistema de QS de *P.aeruginosa* consiste de los homólogos de LuxR/I dependientes de AHL de *V.fischeri*, los cuales son el sistema *las* y el sistema *rhl* que funcionan en tandem para regular directa e indirectamente hasta el 10% del genoma de *P.aeruginosa* [Schuster y Greenberg, 2006].

Muchos de los factores de virulencia producidos por *P.aeruginosa*, extracelulares o asociados a la célula son regulados por los sistemas de QS *las* y *rhl*. (Tabla 1).

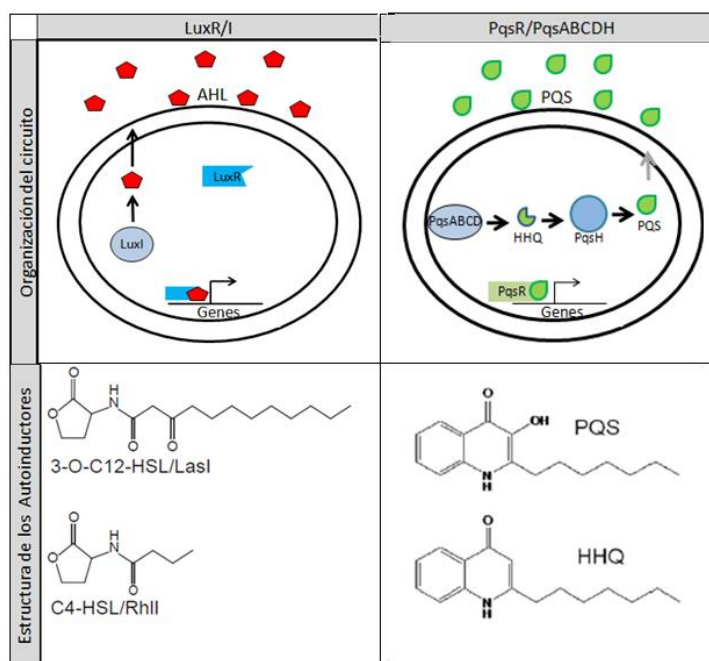


Figura 17. Sistemas de quorum sensing en *P.aeruginosa*.

Dos tipos de sistemas de quorum sensing existen en *P.aeruginosa* el de tipo LuxR/I (a la izquierda) y el de pqsR/ABCD (a la derecha). Los pentágonos rojos son las acil-homoserinlactonas y los círculos verdes las alquil-quinolonas. Los autoinductores de cada sistema se muestran en la parte inferior.

Tabla 1. Ejemplos de factores de virulencia regulados por el sistema de quorum sensing.

| Gen | Proteína |
|--------------------------------------------|------------------------------|
| Regulado predominantemente por LasR | |
| <i>lasB</i> | Elastasa |
| <i>toxA</i> | Exotoxina A |
| <i>aprA</i> | Proteasa alcalina |
| <i>rhlR</i> | RhlR |
| Regulado predominantemente por RhlR | |
| <i>rhlAB</i> | Ramnosil-transferasa |
| <i>lecA</i> | Lectina I |
| <i>lecB</i> | Lectina II |
| <i>hcnABC</i> | Sintasa de ácido cianhídrico |
| <i>phzA1-G1</i> | Sintasas de la pocianina |

El sistema *las* fue el primer sistema de QS descrito en *P.aeruginosa* y este regula la expresión del gen *lasB*, por esta razón recibió el nombre de sistema *las*.

El sistema *las* está constituido por la sintasa del autoinductor LasI, la cual es la responsable de la síntesis de la N-3-oxododecanoil-homoserinlactona (3-oxo-C₁₂-HSL) y por el regulador transcripcional LasR [Passador *et al.*, 1993; Gambello y Iglewski, 1991].

La proteína LasR de acuerdo a ensayos bioquímicas se ha clasificado como de clase I dentro de las proteínas tipo LuxR, ya que requiere la presencia del autoinductor para su plegamiento y una vez plegada se une fuertemente a su autoinductor [Schuster *et al.*, 2004].

El complejo LasR/3-oxo-C₁₂-HSL activa la expresión del gen *lasI* (formando un bucle de autorregulación positiva), y de los genes *rhIR* y *rhII* además del resto de sus genes blanco a través de la unión a las cajas *las* que se encuentran en la región promotora de estos genes y presenta la siguiente secuencia consenso: CT-N₁₂-AG. Es importante mencionar que esta secuencia consenso presenta simetría en las bases intermedias aunque la conservación de las bases es realmente débil [Gilbert *et al.*, 2009].

A pesar del bucle de autorregulación positiva de *lasI* los niveles de 3-oxo-C₁₂-HSL se mantienen relativamente constantes, cuando el medio de cultivo en el que crece *P.aeruginosa* se encuentra amortiguado para evitar la lactonólisis [Yates *et al.*, 2002].

En estas condiciones la homeostasis de la 3-oxo-C₁₂-HSL es mantenida balanceando la activación del gen *lasI* mediada por LasR/3-oxo-C₁₂-HSL y su represión. El regulador transcripcional RsaL que se localiza inmediatamente río arriba de *lasI* y se transcribe en dirección antisentido con respecto a *lasI* reprime directamente la transcripción de este gen y su propia transcripción a través de la unión al promotor bidireccional de los genes *lasI-rsaL*, consecuentemente esto genera un bucle de autorregulación negativa que contrarresta al bucle de autorregulación positivo de LasR/3-oxo-C₁₂-HSL y mantiene la homeostasis de 3-oxo-C₁₂-HSL.

Cuando LasR/3-oxo-C₁₂-HSL y RsaL que pertenece a la familia de las proteínas hélice-vuelta-hélice (H-T-H) se unen al promotor bidireccional *lasI-rsaL* ocupan sitios adyacentes en el DNA de forma que cuando las dos proteínas se encuentran unidas a sus secuencias blanco la actividad represora de RsaL es dominante sobre la actividad activadora de LasR/3-oxo-C₁₂-HSL [Rampioni *et al.*, 2007].

Adicionalmente los niveles de 3-oxo-C₁₂-HSL y por lo tanto la actividad del sistema *las* es modulada por la acción de la AHL acilasas de cadena larga PvdQ y QuiP que degradan a este autoinductor [Huang *et al.*, 2006; Sio *et al.*, 2006].

Como se mencionó anteriormente los genes *rhlR* y *rhlI* son regulados por LasR/3-oxo-C₁₂-HSL con lo cual se coloca al sistema *las* sobre el sistema *rhl* en la jerarquía del sistema de QS dependiente de AHL [Williams y Cámara, 2009].

El sistema *rhl* recibe su nombre debido a que regula la expresión del operón *rhlAB* que codifica para las enzimas responsables de la biosíntesis de los ramnolípidos, siendo la localización de este operón inmediatamente río arriba de los genes *rhlR* y *rhlI* los cuales constituyen al sistema *rhl*, en donde la proteína RhlI es la sintasa del autoinductor butiril-homoserin-lactona (C₄-HSL) y RhlR el regulador transcripcional cognado [Ochsner *et al.*, 1994; Ochsner y Reiser, 1995].

El regulador transcripcional RhlR se clasifica como de clase III dentro de las proteínas tipo LuxR, debido a que no es necesaria la presencia del autoinductor para su plegamiento y la proteína madura puede unirse reversiblemente a su autoinductor. Por otro lado solo es capaz de activar la transcripción de sus genes blanco en presencia de su autoinductor C₄-HSL, ya que en ausencia de C₄-HSL actúa como represor, aunque su función como represor solo se ha reportado para el gen *rhlA* [Medina *et al.*, 2003a].

Los sistemas *las* y *rhl* regulan un conjunto parcialmente sobrelapado de genes. Es importante señalar que algunas cajas *las* pueden ser reconocidas tanto por LasR como por RhlR aunque su actividad como reguladores transcripcionales es diferente. Esto es, en el caso del gen *lasB* el complejo LasR/3-oxo-C₁₂-HSL interaccionan con la cajas *las* de *lasB* y activa la transcripción de este gen, mientras que cuando se encuentra presente RhlR/C₄-HSL solo se logra un 10% de la activación que logra LasR/3-oxo-C₁₂-HSL [Kiratisin *et al.*, 2002].

Otro factor que contribuye a la co-regulación del sistema de QS dependiente de AHL, es el sistema de QS dependiente de 2-alkilquinolonas (AQ). Debido a que la producción dependiente de la densidad celular, pero no de la fase de crecimiento de los factores de virulencia (dependientes del sistema *rhl*) puede ser superada mediante la adición de: la molécula señal quinolona de pseudomonas (PQS), que junto con su

precursor 2-heptil-4-quinolona (HHQ), son las principales AQ que funcionan como moléculas señal en la respuesta QS [Pesci *et al.*, 1999; Diggle *et al.*, 2003].

Se requieren diversos genes para la síntesis de las AQ entre los cuales se encuentra el operón *pqsABCDE* en donde los primeros cuatro genes de este operón son requeridos para la biosíntesis de la HHQ [Williams y Cámara, 2009].

La biosíntesis de HHQ ocurre a través de la condensación cabeza-cabeza del antranilato, el cual es suministrado por los genes *phnAB* o *kynABU*. En primer lugar el antranilato es activado por PqsA para formar el tioéster antraniloil-CoA, que es transferido posteriormente al sitio activo de PqsD, en donde PqsD cataliza la condensación del antraniloil-CoA con el malonil-CoA o malonil-ACP para formar la HHQ. Aunque no se conoce con exactitud el papel de PqsB y PqsC en la biosíntesis de la HHQ se sugiere que participan en la obtención y condensación del malonil debido a que son homólogas a las 3-oxoacil-(proteínas acarreadoras de acilos) sintetasas [Bera *et al.*, 2009; Coleman *et al.*, 2008; Farrow y Pesci 2007].

Río abajo del operón *pqsABCDE* se localiza la monooxigenasa *pqsH* que oxida a la HHQ y la transforma en PQS [Gallagher *et al.*, 2002].

El operón *pqsABCDE* es controlado por el regulador transcripcional PqsR, el cual es miembro de la familia LysR, y utiliza como co-inductor a PQS o HHQ. El complejo PqsR-HHQ/PQS es capaz de incrementar la expresión del operón *pqsABCDE* formando un bucle de autorregulación positiva [Williams y Cámara, 2009].

El sistema de QS dependiente de AQ se encuentra interrelacionado con los sistemas de QS dependientes de AHLs, porque LasR/3-oxo-C₁₂-HSL activa la transcripción de *pqsR* y *pqsH* en tanto que el complejo RhIR/C₄-HSL reprime la transcripción de *pqsABCDE* y *pqsR* (Fig. 22). Esta interrelación se observa a nivel fenotípico en una atenuación de la virulencia como resultado de la mutación de cualquiera de los tres diferentes sistemas de QS [Xiao, 2006; Williams y Cámara, 2009].

El quinto gen del operón *pqsABCDE*, *pqsE* no se requiere para la síntesis de AQ, ya que mutantes en *pqsE* presenta perfiles normales en la producción de AQ. En realidad su función es ser el efector de la respuesta QS dependiente de AQ, debido a que una mutante en el gen *pqsE* presenta una reducción en la producción de pirocianina, ramnolípidos y elastasa, además que su virulencia contra *C. elegans* se encuentra

atenuada, aunque los niveles de AHL y AQ son similares a los de una cepa silvestre [Gallagher *et al.*, 2002; Farrow *et al.*, 2009].

Hasta ahora la función precisa de PqsE no se conoce, pero el análisis de su secuencia indica que PqsE pertenece a la familia de las metalo- β -hidrolasas, que incluye a las metalo- β -lactamasas y las lactonasas degradadoras de AHLs, porque presenta el motivo de aminoácidos HXHDXH y tiene un plegamiento de metalo- β -lactamasa.

Recientemente se encontró que PqsE puede activar a los genes que son regulados por PqsR-HHQ/PQS en ausencia de este sistema entre ellos a los responsables de la biosíntesis de la piocianina y de los ramnolípidos, por lo que sugiere que la función primaria de PqsR es activar la expresión de *pqsE* para que esta proteína module la expresión de sus genes blancos, por lo cual también a PqsE se le ha nombrado como la proteína de respuesta a la señal PQS [Farrow *et al.*, 2009; Williams y Cámara, 2009].

La regulación de la producción de la piocianina y ramnolípidos por PqsE es dependiente de RhIR, debido a que PqsE estimula la actividad de RhIR/C₄-HSL en *E.coli* posiblemente interaccionado directamente con la proteína RhIR y haciéndola que responda de forma más eficiente al autoinductor C₄-HSL, alternativamente se propone que debido a la presencia del motivo HXHDXH PqsE presumiblemente también podría actuar sobre un sustrato que se encuentra tanto en *E.coli* como en *P.aeruginosa* y que sería el responsable de aumentar la actividad de RhIR [Farrow *et al.*, 2009].

Otro factor que contribuye a la superregulación del sistema de QS dependiente de AHL es el regulador transcripcional Vfr (Virulence Factor Regulator) (Fig. 19), el cual es un miembro de la familia de reguladores transcripcionales dependientes de AMPc [3'-5'cAMP receptor proteins (CRP)] debido a que presenta un 91% de similitud y un 67% de identidad con la proteína CRP de *E.coli*, *S. typhimurium*, *K. aerogenes* y *S. flexneri*. Otros miembros de la familia de CRP con los que presentan similitud son la proteína CRP de *H. influenzae* con un 59%, la proteína Clp de *X. campestris* con un 48% y la proteína FNR con un 29% de *E.coli*.

Los residuos fundamentales para la actividad transcripcional de CRP en *E.coli* se encuentran conservados en Vfr, entre estos residuos se encuentran los que participan en la interacción con la RNA polimerasa, en la unión al DNA y los de reconocimiento y unión al AMPc [West *et al.*, 1994].

Vfr funciona como homodímero, y presenta una afinidad por AMPc similar a la que se ha encontrado *in vitro* para CRP de *E.coli*, además que estudios funcionales mostraron que Vfr puede sustituir a CRP ya que la actividad de β -Galactosidasa y Triptofanasa de una mutante en el gen *crp* en *E.coli* se restaura por la introducción de Vfr en *trans*. La actividad de Vfr como regulador transcripcional está controlada por el regulador alostérico AMPc, debido a que en ausencia de AMPc, Vfr es incapaz de restaurar la actividad de β -Galactosidasa y Triptofanasa de una mutante en el gen *crp* [West *et al.*, 1994].

P. aeruginosa codifica para dos Adenilato ciclasas intracelulares (CyaA y CyaB). La proteína CyaA se clasifica como una Adenilato ciclase de clase I, las cuales se encuentran presentes en todos los genomas bacterianos secuenciados y es responsable de una pequeña parte de la producción total de AMPc. Por otro lado CyaB pertenece a las Adenilato ciclase de clase III, en donde se agrupan tanto Adenilato ciclasas bacterianas como de protozoarios, a la vez que se sugiere la localización membranal de CyaB por la presencia de 5 posibles hélices transmembranales. Es necesario mencionar que a pesar de que CyaB contribuye de forma mayoritaria a la producción de AMPc solo en una doble mutante *cyaAB* se elimina por completo la producción de AMPc [Wolfgang *et al.*, 2003].

La evidencia que confirma que Vfr requiere AMPc para ser activo transcripcionalmente en *P.aeruginosa* fue revelada cuando se realizó el perfil transcripcional de mutantes de *P.aeruginosa* incapaces de producir AMPc o Vfr y se encontró que su perfil de expresión era prácticamente el mismo [Wolfgang *et al.*, 2003].

En *P.aeruginosa* Vfr controla diversos factores de virulencia de forma dependiente e independiente del sistema de QS, entre los genes regulados de forma independiente al sistema de QS se encuentran: *fleQ* (es el regulador maestro de la biosíntesis del flagelo), los genes *fimS* y *pilM* (participan en la formación del Pili tipo IV), el gen *toxA* (codifica para la Exotoxina A) y el sistema de secreción tipo III, mediante el cual son transferidas al huésped las Exotoxinas Y, S, U y T (Fig.18) [Wolfgang *et al.*, 2003; Dasgupta *et al.*, 2002].

Por otro lado Vfr es capaz de activar la transcripción del sistema *las* de QS, específicamente la del gen *lasR* en ausencia de AMPc a través de la unión a su sitio de unión (VBS) que se encuentra en la región promotora de *lasR* y que presenta la secuencia TGTGATCT:AGATCACA que es muy cercana a la secuencia consenso (lo

que constituye el único reporte de que un miembro de la familia de CRP presente actividad de regulador transcripcional en ausencia de AMPc sobre un gen).

Hasta el momento Vfr es el único factor transcripcional reportado capaz de inducir la expresión de *lasR*, aunque requiere un factor diferente a sigma 70 para lograr la transcripción de *lasR* *in vitro* [Albus *et al.*, 1997; Fuchs *et al.*, 2010].

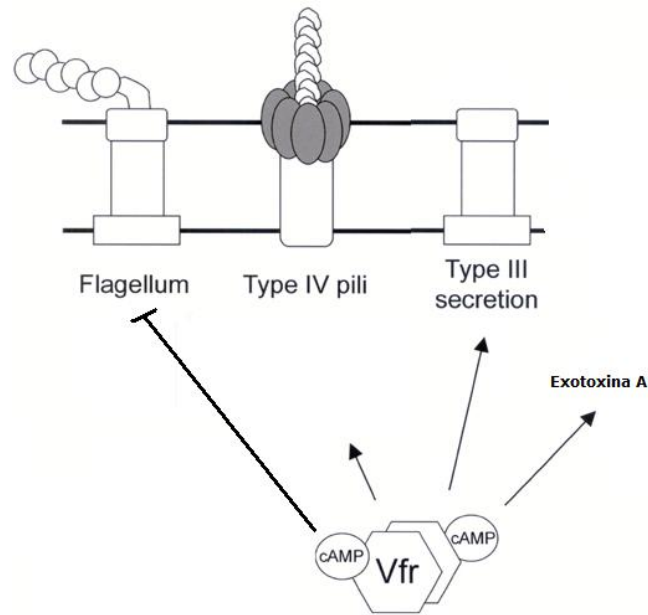


Figura 18. Factores de virulencia regulados de forma directa por Vfr e independientemente del sistema de quorum sensing.

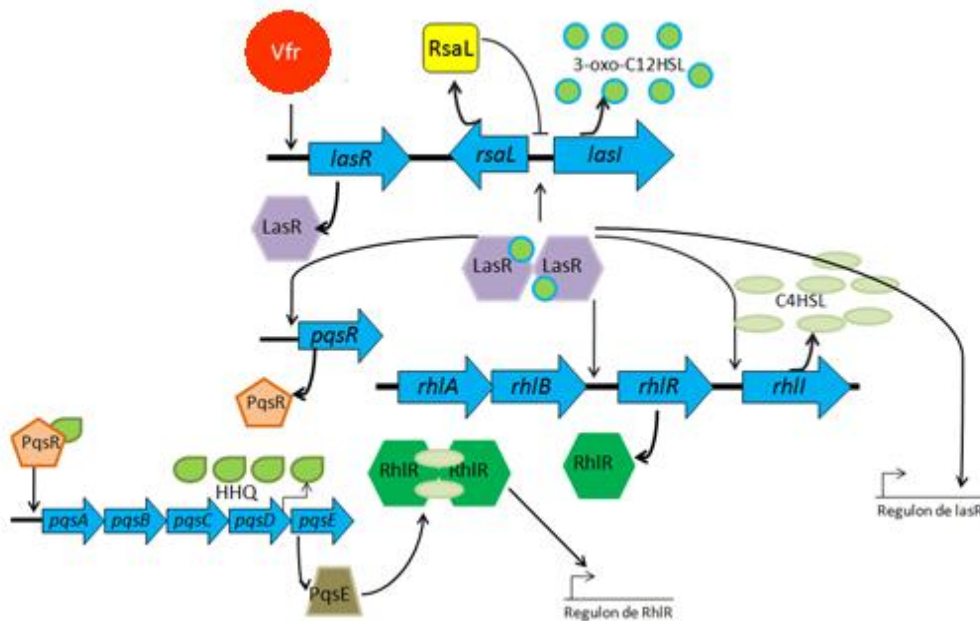


Figura 19. Sistemas de quorum sensing en *P.aeruginosa*.

P.aeruginosa utiliza dos sistemas de QS tipo LuxR/I: LasR (morado) y RhIR (verde). LasI produce el autoinductor 3-O-C12-HSL (círculos verde oscuro) y RhII produce el autoinductor C4-HSL (círculos verde claro). LasR y RhIR se une a sus autoinductores cognados e inducen la expresión génica de sus regulones. Los dos sistemas de QS tipo LuxR/I funcionan secuencialmente, donde los genes controlados por LasR entre los cuales se encuentra *rhIR* son inducidos antes de que se activen los genes regulados por RhIR. El sistema de QS tipo PqsR/PqsABCD funciona como punto de conexión entre los sistemas *las* y *rhI*, PqsR unido a su autoinductor HHQ/PQS activa la expresión del operon *pqsABCDE* y la proteína PqsE estimula la actividad de RhIR. En la parte más alta de esta cascada regulatoria se encuentra la proteína Vfr que activa la transcripción de *lasR* y activa todo el sistema de QS.

Capítulo 2.

ANTECEDENTES

Estudios anteriores encontraron que la producción de los ramnolípidos se incrementa en condiciones de limitación de fosfato, lo que llevó al razonamiento de que para analizar la regulación transcripcional del gen *rhIR* que es el responsable de la activación del operón *rhIAB* que codifica para las enzimas responsables de la biosíntesis de los ramnolípidos, se debe analizar en condiciones de limitación de fosfato para maximizar la probabilidad de encontrar todos los factores que participan en la regulación de la transcripción de *rhIR*.

Al analizar la expresión del gen *rhIR* en *P.aeruginosa* en estas condiciones se encontró que la expresión de *rhIR* depende de cuatro promotores, dos de los cuales están dentro de la región codificante del gen *rhIB* que se encuentra inmediatamente río arriba de *rhIR*.

Entre las proteínas responsable de la activación de la expresión de *rhIR* se descubrió a la proteína LasR como la responsable de la expresión del promotor 1 a través de la unión a una caja *las* que se encuentra río arriba de este promotor y posiblemente también de la expresión del promotor 4. A su vez hay datos que muestran que la proteína Vfr afecta la expresión del promotor 4 y que Vfr podría regular directamente la expresión del promotor 4 a través de la unión al VBS ubicado río abajo del sitio de inicio de la transcripción de este promotor, sin embargo no está claro si este efecto de Vfr sobre el promotor 4 es consecuencia directa de la unión de Vfr a su VBS o un efecto indirecto, debido a que Vfr activa la transcripción de *lasR*, y a su vez el complejo LasR/3-oxo-C₁₂-HSL activa directamente la transcripción de *rhIR* [Medina *et al.*, 2003b; Albus *et al.*, 1997].

Por otro lado el factor sigma 54 participa en la activación del promotor 3, aunque este efecto no es directo debido a la ausencia de la caja de la unión para este factor sigma en el promotor 3 de *rhIR* y aunado al hecho que el factor sigma 54 activa la transcripción del gen *vfr* hace suponer que el efecto del factor sigma 54 en la transcripción de *rhIR* pueda ser indirecto. Finalmente se encontró que la iniciación de la transcripción del promotor 2 es constitutiva [Medina *et al.*, 2003b; Heurlier *et al.*, 2003].

Capítulo 3

HIPÓTESIS

La proteína Vfr activa directamente la transcripción de *rhIR* a través de la unión al VBS que se encuentra río abajo del promotor 4, además de la regulación indirecta que ejerce sobre *rhIR* a través de activar la expresión de *lasR*.

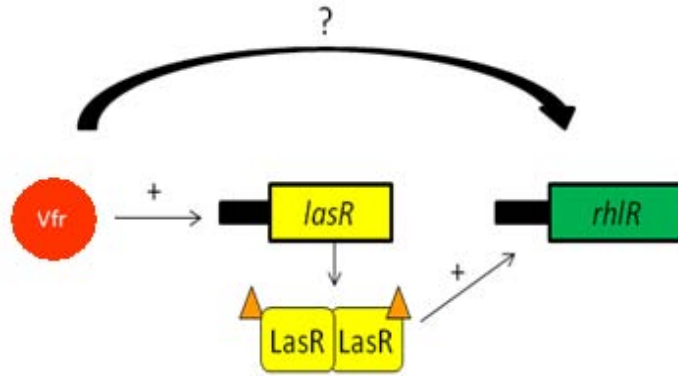


Figura 20. Mecanismo por el cual el regulador transcripcional Vfr puede estar regulando la transcripción de *rhIR*. Vfr regula de forma positiva la transcripción de *LasR* y a su vez *LasR* activa la transcripción de *rhIR* a través del promotor 1. Por otro lado Vfr regularía la transcripción de *rhIR* a través del promotor 4.

Capítulo 4

OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar el papel específico de Vfr en la regulación transcripcional del gen *rhIR* en *Pseudomonas aeruginosa*

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.-Describir el efecto del regulador transcripcional Vfr en la expresión del promotor 4 de *rhIR*.
- 2.-Mutar el probable sitio de unión para Vfr que se encuentren en la región regulatoria de *rhIR*, para comprobar la participación directa de Vfr en la regulación de la expresión de *rhIR*.
- 3.- Determinar la funcionalidad de las cajas *las* en la activación de la transcripción de *rhIR* mediada por LasR.
- 4.-Proponer un modelo integrador de la regulación transcripcional de *rhIR*.

Capítulo 5

MATERIALES Y METODOS

5.1 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio Tabla 2.

| Cepas o Plásmidos | Genotipo o Características relevantes | Fuente |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Cepas | | |
| <i>E. coli</i> | | |
| SA2777 | <i>F his rpsL relA crp::cat</i> | Nam <i>et al.</i> , 2002 |
| DH5 α | <i>F' /endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR [Φ80 <i>dlacZ</i> Δ M15 <i>recA1</i>]</i> | Miller, 1972 |
| TE2680 | <i>F, λ, IN(rrnD-rrnE)1, D(lac)X74, rpsL, galK2, recD1903::Tn10d-Tet, rpDC700::putPA1303::[Kans-Camr-lacZ]</i> | Simons <i>et al.</i> , 1987 |
| T001 | TE2680 <i>rhIR'-lacZ</i> (nt -500 to +242) wild type | Este trabajo |
| T002 | TE2680 <i>rhIR'-lacZ</i> (nt -61: G \rightarrow T; nt -60: A \rightarrow T; nt -59: C \rightarrow G) | Este trabajo |
| T003 | TE2680 <i>rhIR'-lacZ</i> (nt -114: G \rightarrow T; nt -113: C \rightarrow G; nt -112: A \rightarrow T) | Este trabajo |
| TGC001 | SA2777 <i>rhIR'-lacZ</i> (nt -500 to +242) wild type | Este trabajo |
| TGC002 | SA2777 <i>rhIR'-lacZ</i> (nt -61: G \rightarrow T; nt -60: A \rightarrow T; nt -59: C \rightarrow G) | Este trabajo |
| TGC003 | SA2777 <i>rhIR'-lacZ</i> (nt -114: G \rightarrow T; nt -113: C \rightarrow G; nt -112: A \rightarrow T) | Este trabajo |
| <i>P. aeruginosa</i> | | |
| PAO1 | Wild Type | Li <i>et al.</i> , 2007 |
| PAO1-V | <i>vfr::Ω Sp/Sm</i> derivado de la cepa PAO1 | Este trabajo |
| PAO-R1 | <i>lasR::Tet</i> , derivado de la cepa PAO1 | Li <i>et al.</i> , 2007 |
| PAO6301 | PAO1 <i>vfr::Ω Sp/Sm</i> | Fox <i>et al.</i> , 2008 |
| PW6882 | PAO1 _{UV mut^{nt-103+52}} <i>rhIR::Tn' lacZ</i> | Jacobs <i>et al.</i> , 2003 |
| PAO1-WV | <i>vfr::Ω Sp/Sm</i> , derivado de la cepa PW6882 | Este trabajo |
| Plasmidos | | |
| Usados en <i>P. aeruginosa</i> | | |
| plp170 | Vector utilizado para construcción de fusiones transcripcionales con <i>lacZ</i> , capaz de replicarse tanto en <i>P. aeruginosa</i> como en <i>E. coli</i> Ap ^r , Cb ^r | Preston <i>et al.</i> , 1997 |
| pPCS1002 | Región regulatoria de <i>rhIR</i> (del nt -500 al +242) clonado en plp170 para generar Φ (<i>rhIR'-lacZ</i>) | Pesci <i>et al.</i> , 1997 |
| pPGC2001 | Derivado del pPCS1002; con las mutaciones nt -115: G \rightarrow T; nt -114: C \rightarrow G; nt -113: A \rightarrow T | Este trabajo |
| pPGC2002 | Derivado del pPCS1002; con las mutaciones nt -166: C \rightarrow T; nt -165: A \rightarrow T, nt -163: A \rightarrow T | Este trabajo |

| | | |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| PPGC2003 | Derivado del pPCS1002; con las mutaciones (nt-166:C→T; nt-165:A→T; nt-163:A→T) | Este trabajo |
| PPGC2004 | Derivado del pPCS1002; con las mutaciones nt-210:A→T; nt-09:C→G; nt-208:A→T | Este trabajo |
| PPGC2005 | Derivado del pPGC2001; con la mutación (nt-72:C→T) | Este trabajo |
| PPGC2006 | Derivado del pPGC2002; con la mutación nt-118:C→T) | Este trabajo |
| PPGC2008 | Región reguladora de <i>rhIR</i> del nt-469 to -121. Clonado en pIp170. Contiene a los promotores 4 y 3 | Este trabajo |
| PPGC2008-1 | Derivado del pPGC2008; con las mutaciones nt-210:A→T; nt-09:C→G; nt-208:A→T | Este trabajo |
| PPGC2008-2 | Derivado del pPGC2008; con las mutaciones nt-380:C→T; nt-379:T→G | Este trabajo |
| Usados en <i>E.coli</i> PRSS51 | Vector para construcción de fusiones reporteras con <i>lacZ</i> en <i>E.coli</i> . Ap* Km* | Simons et al., 1987 |
| pPGC2010 | Región reguladora de <i>rhIR</i> (del nt-500 al +242) clonado En PRSS51 para generar $\Phi(rhIR-lacZ)$ | Este trabajo |
| PPGC2011 | <i>rhIRp</i> (nt-62: G→T; nt-61:A→T; nt-60:C→G)- <i>lacZ</i> on PRSS51 | Este trabajo |
| PPGC2012 | <i>rhIRp</i> (nt-115: G→T; nt-114:C→G; nt-113:A→T)- <i>lacZ</i> on PRSS51 | Este trabajo |
| Usados en <i>E.coli</i> y <i>P.aeruginosa</i> pMMB66EH | Vector de expresión de amplio rango de huéspedes <i>lacI^s</i> , Ap* | Suh et al., 2002 |
| pWNP28 | Derivado de pMMB66EH, con el gen <i>yfj</i> bajo el control de <i>proc</i> , usado para sobreexpresar a la proteína. | Suh et al., 2002 |
| pUCP20 | Vector de expresión capaz de replicarse en <i>P. aeruginosa</i> y <i>E.coli</i> , con <i>plac</i> :Ap*, Cb* | West et al., 1994 |
| pMT1 | Derivado de pUCP20, con el gen <i>lasR</i> bajo el control de <i>plac</i> , usado para sobreexpresar a la proteína. | Medina et al., 2003a |
| PGMVC | Derivado de pUCP20, con el gen <i>rhIR</i> bajo el control de <i>plac</i> , usado para sobreexpresar a la proteína. | Medina et al., 2003a |

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

| Plásmido ^a | Cadena ^b | Secuencia del Oligonucleótido (5'→3') ^c |
|----------------------------|---------------------|----------------------------------------------------|
| pPGC2007 | + | CTGGGAGAAATTCCTGCCATCGTGCGC |
| | - | ACCTGGGCTCTAGA CCGCAA G |
| pPGC2008 | + | CTGGGAGAAATTCCTGCCATCGTGCGC |
| | - | CTGTTATGCCGGATCCGTT CAGGACGC |
| pPGC2001 | + | GGCAAGGCTGCGCGCTTTTGAGCGTCATACCCC |
| | - | GGGGTATGACGCTCAAAAGCGCGCAGCCTTGCC |
| pPGC2002 | + | GCGTCCTGAACGGTGCTGTGTTAACAAGATAGGGTTGCCA |
| | - | TGGCAACCCTATCTGTTAAACAAGCACCCTT CAGGACGC |
| pPGC2003 | + | GCCCAGGTGGTCGAAAGTTGTTTGGGAGGGGGAT |
| | - | ATCCCCCTCCCAAAACAACGTTGACCCACCTGGGC |
| pPGC2004 | + | CATGGAATTGTCAAAACGCTGTGTATCGCTTGCAGTAAGCG |
| pPGC2008-1 | - | CGCTTTACCGCAAGCGATACAGCGGTTGTGACAATTCATG |
| pPGC2005 | + | CCGTATC GGCAAGGTTGCGCGCTTTT GAG |
| | - | CTCAAAGCGCGC AACCTGCGGATACGG |
| pPGC2006 | + | CTGCGTCCTGAACGGTGTTGTGTTAACAGATAGGG |
| | - | CCCTATCTGTTAACACAAACCCGTTCAAGGACGCAG |
| pPGC2008-2 | + | CAGGTGCTGCTGCTGTTGTTGCCACGACCCAG |
| | - | CTGGTCGTGGGCACCAGGCAGCAGCACTG |
| Nombre del oligonucleótido | | |
| R-rhIABR | | GCC CAA GCTTTC GTG GAT CGG CTG C |
| rhIA | | CGAACTCTACGGAATTCGGGATACC |

^a Plásmido que fue construido utilizando el respectivo oligonucleótido.

^b Cadena de DNA que contiene la respectiva secuencia del oligonucleótido.

+ *rhIR* Cadena codificante - *rhIR* Cadena No codificante

^c Las bases mutadas en el oligonucleótido se encuentran subrayadas.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron diseñados usando la secuencia del genoma de la cepa PAO1 de *P.aeruginosa* y el programa Fast PCR, posteriormente fueron sintetizados en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

5.2 Mantenimiento de cepas

En el laboratorio la colección de cepas se mantiene almacenada en medio Gherna a -80°C. De un cultivo en fase exponencial de cada cepa en medio LB se toman 1000 µL, los cuales se centrifugaron a 1400 rpm, durante 1 minuto, se decantó el sobrenadante y se resuspendieron en 500 µL de medio Gherna y se depositó en el ultracongelador.

5.3 Medios de cultivo, antibióticos y suplementos utilizados

Los medios de cultivos utilizados fueron Luria-Bertani (LB) (triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1% w/v) y el medio fosfato-peptona-glucosa –sales de amonio (PPGAS) el cual tiene la siguiente composición : NH₄Cl (0.02 M), KCl (0.02 M), Tris-

HCl (0.12 M), MgSO₄ (0.0016 M), glucosa (0.5%, w/v) y peptona (1 %, w/v), para los cultivos en medio sólido se agregó agar al 1.4 %, w/v.

Los antibióticos utilizados se muestran en la Tabla 4. Los cuales fueron esterilizados por filtración a través de una membrana con poro de 0.22 µm y adicionados al medio en condiciones de esterilidad cuando presentaban una temperatura menor a 50 °C. Cuando fue necesario agregar X-gal al medio de cultivo este se utilizó a una concentración de 40 µg/mL.

Tabla 4. Antibióticos utilizados en los medios de cultivo.

| | Antibiótico | Concentración | | Antibiótico | Concentración |
|---------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>P.aeruginosa</i> | Carbenicilina | 200 µg/mL | <i>E.coli</i> | Ampicilina | 200 µg/mL |
| | Estreptomicina | 600 µg/mL | | Kanamicina | 75 µg/mL |
| | | | | Cloramfenicol | 30 µg/mL |
| | Tetraciclina | 150 µg/mL | | Tetraciclina | 30 µg/mL |

5.4 Técnicas moleculares empleadas para manipular al DNA:

5.4.1 Reacciones de Restricción

Las digestiones se realizaron utilizando la enzima correspondiente en cada caso, las cuales fueron adquiridas de la casa comercial New England Biolabs, se empleó el buffer de reacción más adecuado para llevar a cabo la digestión correspondiente. Un microgramo de DNA se digirió con 10 U de cada enzima, durante 3 h a 37 °C.

5.4.2 Reacciones de Ligación

En las reacciones de ligación se utilizó a la enzima T4 DNA Ligasa (Invitrogen), y las reacciones se realizaron a 4 °C durante 16 h, utilizando 200 ng de vector con una relación vector:inserto 1:3 y 1 U de la enzima.

5.4.3 Purificación de DNA cromosomal

La obtención de DNA cromosomal para la amplificación de fragmentos de DNA por la técnica de la PCR, se realizó utilizando el kit Wizard Genomics Promega DNA Purification de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.4.4 Purificación de plásmidos

La obtención del DNA plasmidico se realizó de la siguiente manera:

- A partir de un cultivo de 30 mL que se creció durante toda la noche y se encuentra saturado, centrifugarlo durante 2 min a 14 000 rpm.
- Resuspender el pellet en 1/10 de una solución TRIS-HCl 25mM, EDTA 25 mM pH 8.0 del volumen inicial (3 mL) e incubarlo en hielo durante 10 min.
- Agregar 2 mL de la solución de lisis preparada recientemente (SDS 1% NaOH 0.2 N) y agitar la mezcla hasta observar que se la solución se vuelve transparente e incubarla en hielo durante 10 min.
- Posteriormente adicionar 1.5 mL de Acetato de potasio 3 M pH 4.8 y dejar esta mezcla en hielo durante 15 min.
- Agregar 4 mL de una mezcla fenol:CHCl₃ mezclar y centrifugar a 14000 rpm durante 2 min.
- Tomar la fase acuosa (superior), transferirla a un nuevo tubo y agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar el DNA e incubarlo a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Centrifugar durante 2 min a 14 000 rpm y eliminar el etanol por decantación.
- El botón de plásmido obtenido resuspenderlo en 100 µL de TRIS-HCl 25mM, EDTA 25 mM pH 8.0, posteriormente adicionarle RNAsa (8 µg), y permitir la incubación a 37 °C.
- Eliminar la RNAsa mediante dos adiciones de un volumen de fenol:CHCl₃.
- A la fase superior obtenida de las adiciones de la mezcla fenol:CHCl₃ agregarle un volumen de CHCl₃, mezclar y posteriormente centrifugar durante 2 min a 14 000 rpm.
- Tomar la fase superior y transferirla a un tubo nuevo, donde se precipita con un volumen de isopropanol, y a continuación centrifugar 2 min a 14 000 rpm.
- Permitir la evaporación del isopropanol dejando destapado el tubo durante toda la noche y resuspender en 50 µL de H₂O.

5.4.4 Purificación de fragmentos de DNA

Para limpiar los productos de PCR, fragmentos de DNA o plásmidos digeridos, de proteínas y otros reactivos que pudieran afectar pasos subsecuentes en su manipulación se utilizó el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean up system (Promega) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

5.5 Construcción de las cepas PAO1-WV y PAO1-V mediante transducción

Para generar la mutante *vfr* en la cepa PAO1 utilizada en el laboratorio, y la doble mutante *rhIR*, *vfr* en la cepa PW6882, el gen *vfr::ΩSp/Sm* de *P.aeruginosa* PAO6301 se transdujo utilizando el protocolo mostrado a continuación.

5.5.1 Transducción mediada por el bacteriófago E79tv-2

Se utilizó al bacteriófago E79tv-2 que es capaz de mediar la transducción generalizada en *P.aeruginosa*, siendo este fago una variedad del bacteriófago virulento E79, cuya característica fundamental es su incapacidad de matar a las transductantes.

Procedimiento:

Preparación de los lisados de la cepa donadora.

- Poner un cultivo de la cepa donadora (PAO6301) en LB y permitir su crecimiento a 37°C con agitación (225 rpm) ON.
- Combinar 100 µL del bacteriófago 1×10^9 UFP/mL con 100 µL de la cepa donadora 1×10^8 células/mL y agregar CaCl_2 para obtener una concentración final de 10 mM.
- Incubar a temperatura ambiente la mezcla durante 15 minutos, posteriormente combinarla con 3 mL de LB agar suave (0.8% de agar) y vaciar la mezcla en cajas de LB preparadas recientemente.
- Después de 14 a 16 horas de incubación a 37°C agregar 4 mL de LB al agar suave que contiene a los fagos, recoger la superficie del agar y se transfiere a un tubo de 50 mL.
- Adicionalmente agregar 3 mL de LB y agitar suavemente a temperatura ambiente durante 4 h para permitir la liberación de los fagos del agar suave.

- Posteriormente centrifugar la mezcla a 4000 rpm para remover las bacterias y el agar de los fagos. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y se agregan 6 gotas de CHCl_3 para lisar a las células que quedaron viables.
- Mezclar en el vortex durante 30 s. El título del bacteriófago se debe encontrar entre 10^{10} y 10^{11} UFP/mL.

Transducción de la mutación a la cepa receptora.

- Poner un cultivo de la cepa receptora (PAO6301) en LB y permitir su crecimiento a 37°C con agitación ON (225 rpm).
- Mezclar en tubos:
- 100 μL del bacteriófago 1×10^9 UFP/mL con 100 μL de la cepa receptora 5×10^8 células/mL
- 50 μL del bacteriófago 1×10^9 UFP/mL con 100 μL de la cepa receptora 5×10^8 células/mL
- 10 μL del bacteriófago 1×10^9 UFP/mL con 100 μL de la cepa receptora 5×10^8 células/mL
- 1 μL del bacteriófago 1×10^9 UFP/mL con 100 μL de la cepa receptora 5×10^8 células/mL
- En todos los casos agregar CaCl_2 a una concentración final de 10 mM.
- Incubar posteriormente 15 minutos sin agitación a 37°C y se platea la mezcla de transducción en cajas suplementadas con el antibiótico de selección.

5.6 Análisis de la región regulatoria de *rhIR*. Búsqueda de sitios de unión de Vfr

La búsqueda de probables sitios de unión de Vfr se realizó utilizando la secuencia consenso de Vfr descrita $\text{AnWWTGnGAWnY} : \text{AGWTCACAT}$ donde $W=A$ o T , $Y=T$ o C , $M=A$ o C , $N=G$, T , A o C utilizando el programa Fuzznuc de la paquetería de EMBOSS, la región analizada comprende los 500 nucleótidos que se encuentran río arriba del sitio de inicio de la traducción de *rhIR*.

5.7 Construcción de fusiones reporteras.

Para poder simplificar la detección de la expresión de algunos genes en determinadas condiciones de cultivo se realizan fusiones transcripcionales con genes reporteros.

En este caso se realizaron fusiones transcripcionales de la secuencia promotora del gen *rhIR* con la secuencia del gen reportero *lacZ*. El gen *lacZ* codifica para la proteína β -galactosidasa, cuya actividad es fácilmente cuantificable a través de un ensayo

colorimétrico (ver actividad de β -galactosidasa). Así la actividad de β -galactosidasa medida en estas fusiones es directamente proporcional a la expresión del gen *rhIR*.

El primer paso en la construcción de las fusiones fue la clonación de la región regulatoria del gen *rhIR* en el plásmido plp170 o pRS551, posteriormente se realizó la transferencia de la fusión a una cepa Δlac . La introducción de las fusiones que se encontraban en el plásmido pRS551 al cromosoma se realizó mediante el uso de la cepa TE2680 (Elliot, 1992), la cual es una cepa *recD* que permite la recombinación de DNA lineal con una mayor eficiencia. La recombinación en la cepa TE2680 se lleva a cabo en el operón de triptófano que se encuentra modificado.

i) Procedimiento construcción plásmidos:

Para obtener al vectores reportero pPGC2008, el fragmento que contienen a la región regulatoria de *rhIR* que abarca del nt -468 al -120 fue amplificada mediante la técnica de la PCR utilizando la *Pfu* DNA polimerasa (Stratagene) y su par de oligonucleótidos diseñados para presentar sitios de restricción para las enzimas *EcoRI* y *BamHI*, el amplicón obtenido, posteriormente fue digeridos con las enzimas de restricción anteriormente mencionadas y el fragmento resultante fue ligado en el vector plp170 digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*.

ii) Procedimiento para la generación de mutaciones puntuales:

Para obtener los vectores reporteros pPGC2001-06 que presentan las mutaciones puntuales en los posibles VBS, se uso como templado al plásmido pPCS1002 y se utilizó el kit QuikChange XL site-directed mutagenesis (Stratagene), preparándose las muestras de reacción como se muestra a continuación:

- 5 μ L de DMSO
- 5 μ L del Buffer de Reacción 10X
- 1 μ L del Oligonucleótido + (125ng/ μ L)
- 1 μ L del Oligonucleótido - (125ng/ μ L)
- 2 μ L de pPCS1002 (10 ng/ μ L)
- 1.5 μ L de la mezcla de dNTPs (10mM)
- 33.5 μ L de H₂O (grado millipore)
- 1 μ L de *PfuUltra* HF DNA polimerasa (2.5 U/ μ L)

Posteriormente la mezcla de reacción se llevó a cabo en el termociclador utilizándose los parámetros que se muestran a continuación:

| Segmento | Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|----------|--------|-------------|--------|
| 1 | 1 | 95°C | 1 min |
| 2 | 18 | 95°C | 1 min |
| | | 55°C | 1 min |
| | | 68°C | 10 min |
| 3 | 1 | 68°C | 7 min |

Al finalizar los ciclos, las mezclas de reacción se enfriaron en hielo durante 2 minutos y se agregó 1.2 μL de la enzima de restricción *DpnI* (10U/ μL), se mezcló suavemente en el vortex 4 s y se incubaron las mezclas de reacción durante 2 h a 37°C para digerir el DNA que se encuentra metilado (Fig. 21).

Posteriormente se transformaron 10 μL de reacción en *E. coli* utilizando el protocolo respectivo.

Nota: Los oligonucleótidos utilizados en la construcción de los vectores reporteros pPGC2001-06 se muestran en la Tabla 2. Los cuales se diseñaron utilizando el programa QuikChange® Primer Design (Aligent Technologies) y fueron sintetizados en la compañía Eurofins MWG/operon.

Los plásmidos pPGC2001-06 fueron secuenciados para verificar la introducción de las mutaciones.

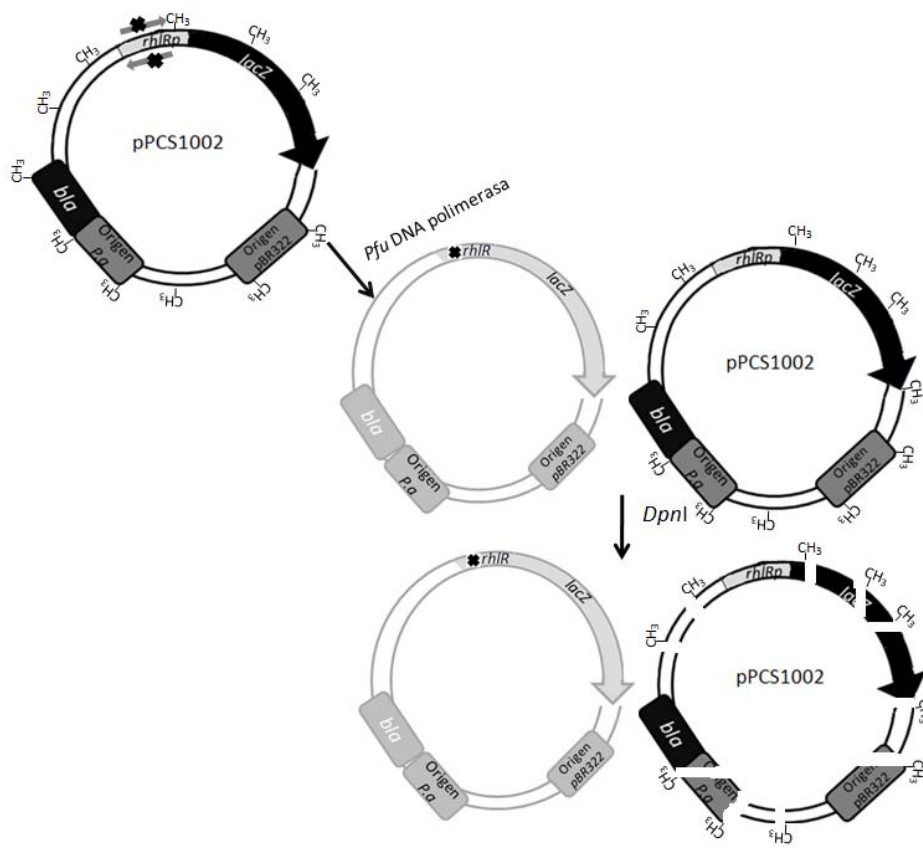


Figura 21. Construcción de los plásmidos pGC2001-06. El plásmido pPCS1002 se utilizó como templado, el cual se encuentra metilado, se desnaturalizó para permitir el alineamiento de los oligonucleótidos que presentan la mutación deseada y se realizó la replicación del plásmido completo utilizando a la *Pfu Ultra* DNA polimerasa. A continuación la mezcla de plásmidos obtenidos es sujeta a la acción de la endonucleasa *DpnI* la cual reconoce únicamente al DNA metilado digiriendo al DNA templado padre y selecciona a los plásmidos que llevan la mutación específica los cuales no son degradados por la endonucleasa *DpnI*.

iii) Procedimiento para la construcción de los vectores reporteros de la expresión de *rhIR* en *E. coli*:

Para construir los plásmidos pPGC2010, pPGC2011 y pPGC2012, las correspondientes fusiones transccripcionales *rhIR-lacZ* fueron liberadas del vector plp170 por medio de la digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* e introducidas en el plásmido pRS551 previamente digerido con las mismas enzimas (Fig. 22).

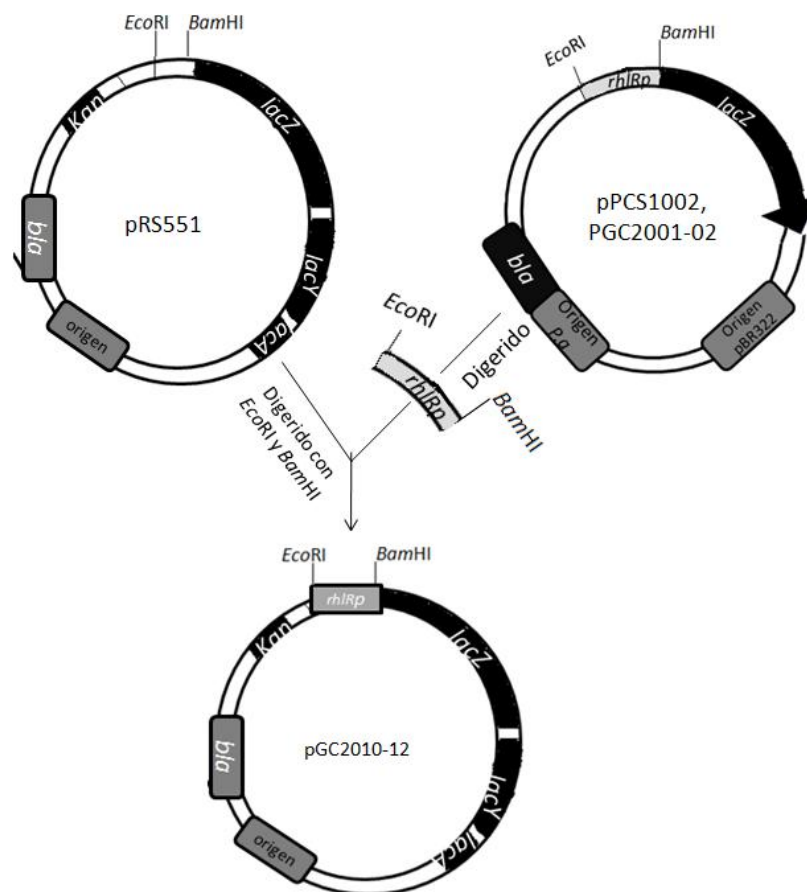


Figura 22. Construcción de los plásmidos pGC2010-12. El plásmido pRS551 y la región regulatoria deseada de *rhIR*, que se encontraban en el vector plp170 fueron digeridos con *EcoRI* y *BamHI*, el fragmento obtenido fue ligado en los sitios *EcoRI* y *BamHI* de pRS551.

5.8 Transformación

La transformación es el proceso por el cual la célula bacteriana puede tomar DNA del medio extracelular. Aunque este proceso ocurre naturalmente en algunas bacterias, la técnica de transformación fue el primer sistema bacteriano de transferencia genética descrito. Las células recombinantes son llamadas transformantes (Miller, 1992).

Procedimiento *E. coli*:

- Permitir que la cepa de *E. coli* a transformar crezca en LB a 37°C con agitación, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (D.O_{600nm} de 0.3-0.4).
- Centrifugar durante 3 minutos a 8000 rpm y resuspender en 1/10 del volumen original del cultivo, en solución fría de transformación y almacenamiento (Consiste de LB con PEG 3350 o 8000 10% w/v, DMSO 5% w/v y MgCl₂ 20 mM pH 6.5).
- Mezclar 100 µL de células competentes con un máximo de 10 µL del DNA plasmídico a transformar e incubar en hielo durante 30 min.
- Posteriormente agregar 900 µL de LB y permitir a las células crecer durante 1h a 37°C con agitación (225 rpm) para permitir la expresión de los genes que confieren la resistencia al antibiótico.
- Plaquear en cajas de agar que contienen al antibiótico de selección e incubar las cajas durante 24 h.

Procedimiento *P.aeruginosa*:

- Permitir que la cepa de *P.aeruginosa* a transformar crezca en LB caldo a 37°C con agitación, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (D.O_{600nm} de 0.5-0.6).
- Enfriar los cultivos introduciéndolos en un recipiente de plástico con agua-hielo durante 10 min.
- Centrifugar 3 min a 8000 rpm y eliminar el sobrenadante.
- Lavar las células con MgCl₂ 150 mM (frío) utilizando la mitad del volumen inicial.
- Centrifugar 3 min a 8000 rpm y eliminar el sobrenadante.
- Repetir el lavado una vez más.
- Resuspender el botón celular en la mitad de volumen inicial del cultivo e incubar 1 h en hielo con agitación ocasional.
- Centrifugar 3 min a 8000 rpm y eliminar el sobrenadante.

- Resuspender el botón celular en 1/50 del volumen inicial del cultivo utilizando una solución de MgCl₂ 150 mM y glicerol al 15% (frío).
- Posteriormente mezclar 20 µL de células competentes con un máximo de 10 µL del DNA plasmídico a transformar e incubar en hielo durante 60 min.
- Cambiar la mezcla de transformación que se encuentra en hielo rápidamente al termomixer que se encuentra a 37°C e incubar con agitación suave durante 3 min.
- Transferir la mezcla a un recipiente de plástico con hielo durante 5 min.
- Agregar 1 mL de LB precalentado a 50°C e incubar con agitación (225 rpm) durante 2h.
- Centrifugar 2 min a 14000 rpm, resuspender el botón celular obtenido en 100 µL y platearlo en cajas con el antibiótico de selección.
- Incubar las cajas de agar durante 24 h.

5.9 Construcción de las cepas T001-003

Para la construcción de estas cepas los plásmidos pPGC2010-12 fueron linearizados con *SacII* transformados en la cepa TE2680 en donde se seleccionaron colonias resistentes a kanamicina. A las transformantes obtenidas se le realizaron ensayos de susceptibilidad a los antibióticos ampicilina y cloramfenicol, una condición que nos indica la integración de estas fusiones en el cromosoma de TE2680 específicamente en el operón de triptófano (Fig. 23).

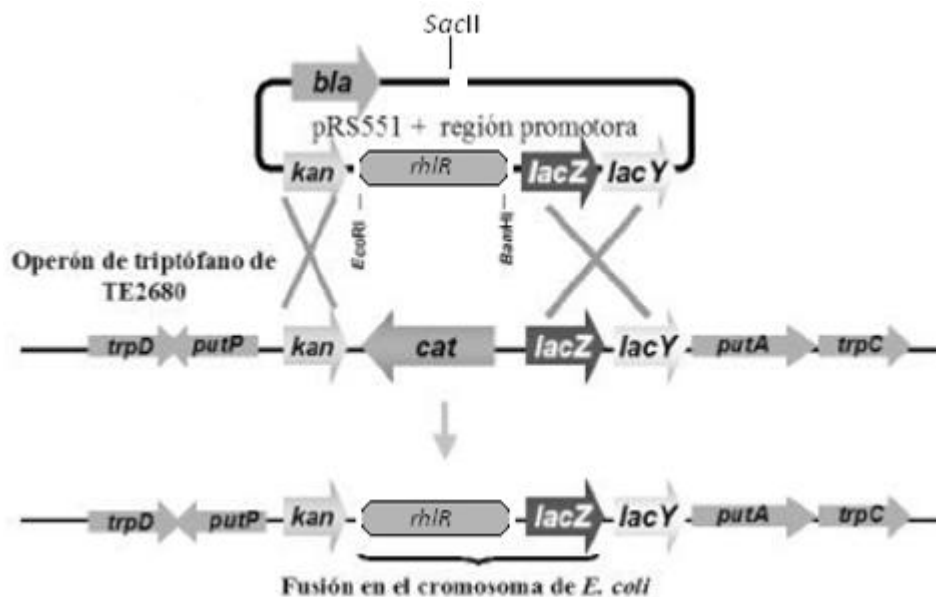


Figura 23. Esquema que muestra la construcción de las fusiones transcripcionales con *lacZ* que se encuentran en monocopia en el cromosoma de la cepa TE2680.

5.10 Construcción de las cepas TGC001-03 mediante transducción

Para transferir las fusiones del cromosoma de la cepa TE2680 al cromosoma de la cepa SA2777, con la finalidad de evitar posibles interferencias de CRP en la interpretación de los resultados, debido a la similitud que presenta con Vfr, y a que previamente se reportó que heterodímeros Vfr-CRP son incapaz de activar la transcripción de un gen blanco, se utilizó al bacteriófago P1_{vir} para lograr la transducción de las fusiones transcripcionales.

5.10.1 Transducción mediada por el bacteriófago P1_{vir}

La transducción es el proceso que permite la transferencia de un fragmento de DNA de una célula a otra, usando un bacteriófago como transportador de DNA. Este proceso permite a la bacteria adquirir un fragmento de DNA de entre 50-100 Kpb de longitud. Hay dos tipos de transducción, la generalizada y la especializada. En la transducción generalizada se permite la transferencia de cualquier fragmento del cromosoma. Después de la infección el DNA es cortado y los fragmentos de DNA son empaquetados por el fago, posteriormente el fago vuelve a infectar a otra bacteria transfiriendo el DNA de la primer célula a la segunda, en donde, por recombinación los fragmentos de DNA se insertan en el cromosoma de la nueva célula (Miller, 1992).

Procedimiento

Preparación de los lisados de la cepa donadora con el bacteriófago P1_{vir}

- Poner un cultivo de la cepa a transducir (donadora) en LB + CaCl₂ 5 mM y permitir su crecimiento a 37°C con agitación (225 rpm) ON.
- Centrifugar 1.5 mL del cultivo a 14,000 rpm por 3 minutos.
- Resuspender el pellet en la mitad del volumen inicial.
- Mezclar en tubos de ensayo:
 - 100 µl de células (Control Negativo)
 - 100 µL de células + 10 µl de fago P1_{vir}
 - 100 µL de células + 100 µL de fago P1_{vir}
- Incubar a temperatura ambiente 15 minutos.
- Agregar 3 mL de LB + CaCl₂ 5 mM.
- Incubar a 37°C hasta observar lisis.
- Recuperar el lisado en un tubo eppendorf.
- Centrifugar a 14000 rpm por 3 minutos.

- Recuperar el lisado en un tubo eppendorf y agregar 2 gotas de cloroformo con una pipeta Pasteur y mezclar en vortex.
- Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos.
- Almacenar a 4°C.

Transducción de la mutación a la cepa receptora.

- Agregar 100 μL de un cultivo reciente de la cepa receptora (SA2777) en 10 mL de LB y permitir su crecimiento a 37°C con agitación vigorosa (225 rpm) hasta alcanzar una D.O_{600nm} de 0.35-0.40 (1×10^8 células/mL)
- Concentrar el cultivo 10 veces centrifugándolo a 14000 rpm y resuspenderlo en 1 mL de triptona al 1% para obtener 1×10^9 células/mL.
- Mezclar los componentes en el siguiente orden:
- 500 μL (1×10^8 células/mL) de la cepa bacteriana receptora.
- 500 μL de una solución CaCl₂ 15 mM y MgSO₄ 30 mM, e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- 500 μL del bacteriófago P1_{vir} que se encuentra en medio LB, aproximadamente 5×10^7 UFP/mL. Incubar sin agitación a 37°C durante 20 minutos.
- Centrifugar la mezcla de transducción a 5000 rpm por 2 minutos y resuspender la pastilla celular en 1.5 mL de MgSO₄ 10 mM.
- Repetir el paso anterior para retirar al máximo los bacteriófagos libres.
- Resuspender el pellet celular en 200 μL de MgSO₄ 10 mM.
- Sembrar por espatulado en el medio selectivo.
- Incubar a a 37°C durante 48 horas.

5.11 Condiciones de crecimiento de las cepas de *E.coli* y *P.aeruginosa*

Procedimiento *E. coli*:

Las cepas de *E.coli* se crecieron a 37°C en medio LB, cuando se crecieron en medio líquido, el volumen del medio ocupaba 1/5 del volumen total del matraz y se agitó a una velocidad de 225 rpm. El crecimiento se monitorió midiendo la densidad optica a 600 nm (O.D₆₀₀).

En los ensayos realizados para determinar la capacidad de Vfr y LasR de activar la transcripción de *rhIR*. Los cultivos de la cepas TGC001-03 con los plásmidos pWNP28 o pMT1, y sus respectivos vectores vacíos fueron crecidos durante toda la noche a 37°C en medio LB suplementado con ampicilina 200 $\mu\text{g/mL}$, posteriormente las cepas

TGC001-003 se subcultivaron en LB suplementado con MOPS 50 mM (pH 7.0) partiendo de una densidad inicial de 0.05, cuando alcanzaron la DO_{600nm} de 0.4 se adicionó IPTG a una concentración final de 1mM y 3-oxo-C₁₂-HSL concentración final 5 μ M únicamente para las cepas con el plásmido pMT1, después de adicionar estos compuestos se les permitió a los cultivos crecer una hora y media más, al terminar este tiempo las células fueron colectadas y se realizaron los ensayos de actividad de β -Galactosidasa.

Procedimiento *P.aeruginosa*:

Las cepas de *P.aeruginosa* se crecieron a 37°C en medio LB de la misma forma que se describió anteriormente para *E.coli*.

En los ensayos realizados para evaluar el papel de Vfr en la regulación transcripcional de *rhIR* cultivos de las cepas de *P.aeruginosa* PAO1, PAO-R1, PAO1-V, PW6882 y PAO1-WV que llevan la correspondiente fusión transcripcional del promotor de *rhIR* fusionado con el gen *lacZ* se crecieron ON a 37°C en LB, suplementado con carbenicilina 200 μ g/mL, posteriormente se subcultivaron en PPGAS con una densidad inicial ($D.O_{600nm}$) de 0.05 y se permitió su crecimiento a 37°C con agitación hasta que las células alcanzaron la fase exponencial tardía ($D.O_{600nm}$ de 1.5). Posteriormente se procedió a determinar la actividad de β -Galactosidasa de las muestras que se tomaron.

Cuando se evaluó el papel de las proteínas RhIR, Vfr y LasR, que se encuentran en un plásmido de expresión en la regulación de *rhIR*. Los cultivos de la cepa PW6882 con el plásmido de expresión correspondiente se crecieron ON a 37°C en LB, suplementado con carbenicilina 200 μ g/mL, y tetraciclina 150 μ g/mL, posteriormente se subcultivaron en PPGAS con una densidad inicial ($D.O_{600nm}$) de 0.05 y se permitió su crecimiento a 37°C con agitación vigorosa (225 rpm) en el caso de la cepa que presentaba al plásmido que expresa Vfr y su vector vacío cuando se alcanzó la D.O. de 0.4 se agregó IPTG 1mM y se procedió a dejar que las células alcanzaran la fase exponencial tardía ($D.O_{600nm}$ de 1.5). Subsecuentemente se procedió a determinar la actividad de β -Galactosidasa de las muestras que se tomaron.

5.12 Ensayos de actividad de β -Galactosidasa

Uno de los genes reporteros utilizados en estudios sobre regulación genética, es el gene *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa. El sustrato de esta enzima es la lactosa, pero también puede actuar sobre análogos de esta molécula, uno de ellos

es el cromóforo *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), cuya hidrólisis puede detectarse por la producción de color, midiendo absorbancia a 420 nm (Miller, 1992).

Para calcular la actividad de β -galactosidasa se usa la fórmula de Miller:

$$UM = 1000 (DO_{420nm} - (1.75 \times D.O_{550nm})) / (t \times V \times D.O_{600nm})$$

Donde: t= tiempo de reacción

V= volumen de células en suspensión (ml)

En la absorbancia a DO_{420nm} se mide la hidrólisis de ONPG; mientras que a DO_{550nm} se mide la dispersión de la luz debida a los restos celulares y la turbidez.

Procedimiento

- Tomar 1 mL del cultivo de la cepa a analizar y centrifugar 3 minutos a 14 000 rpm.
- Resuspender el pellet de células en 1 mL de NaCl al 0.8% frío.
- Centrifugar 3 minutos a 14 000 rpm.
- Resuspender el botón celular en 1 mL de buffer Z con β -mercaptoetanol 0.05 M.
- Medir D.O. a 600nm usando como blanco 1 mL de buffer Z con β -mercaptoetanol.
- Hacer por triplicado en cada cepa lo siguiente:
 - Mezclar 20 μ L de células + 980 μ L de buffer Z con β -mercaptoetanol
- Agregar 2 gotas de cloroformo y 2 gotas de SDS al 0.1% con una pipeta Pasteur.
- Mezclar en vortex el mismo tiempo y velocidad para cada tubo. El tubo control se trata de la misma forma.
- Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Agregar 200 μ L de ONPG a una concentración de 4 mg/mL en intervalos de 15 segundos entre tubo y tubo (para controlar el tiempo en cada tubo) y mezclar en vortex el mismo tiempo y velocidad para cada tubo. El ONPG es el sustrato de la β -galactosidasa que al hidrolizarse por esta enzima, presenta un máximo de absorbancia a 420nm.
- Incubar a temperatura ambiente hasta observar la aparición de el color amarillo.
- Agregar 500 μ L de Na_2CO_3 1M (también a intervalos de 15 segundos entre cada tubo) para detener la reacción del ONPG.

- Medir la absorbancia a 420 nm y 550 nm (a 550nm se mide la densidad celular) de los tubos y usar el control como blanco.
- Calcular las unidades Miller (cantidad de ONPG hidrolizado por minuto por función de densidad óptica).

5.13 Ensayos de RT-PCR

Para los ensayos de RT-PCR usados para determinar la presencia del transcrito que abarca del gen *rhIA* hasta el gen *rhIR* se creció a la cepa PAO1 y a la mutante *rhIA::TclacZ* en PPGAS hasta que alcanzaron una D.O._{600 nm} de 1.6. La extracción de RNA se lleva a cabo de la siguiente forma:

5.13.1 Extracción de RNA

Para la extracción del RNA total se utilizó al Kit RNeasy de invitrogen de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y posteriormente se siguió el siguiente protocolo para eliminar cualquier rastro de DNA que no se haya eliminado.

- Agregar 200 μ L de fenol saturado con acetato de sodio pH 5.0 previamente calentando a 65°C.
- Vortexear durante 5 segundos y agitar a 300 rpm durante 10 minutos a 65°C.
- Centrifugar 2 min a 14 000 rpm a temperatura ambiente para separar las dos fases, tomar la fase acuosa (superior) y pasarla a un tubo eppendorf nuevo.
- Agregar 200 μ L de fenol saturado con acetato de sodio pH 5.0 previamente calentando a 65°C.
- Vortexear durante 5 segundos y agitar a 300 rpm durante 10 minutos a 65°C.
- Centrifugar 2 min a 14 000 rpm a temperatura ambiente para separar las dos fases, tomar la fase acuosa y pasarla a un tubo eppendorf nuevo.
- Agregar 200 μ L de CHCl₃:alcohol isoamilico (24:1).
- Vortexear durante 5 segundos y agitar a 300 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 2 min a 14 000 rpm a temperatura ambiente para separar las dos fases, tomar la fase acuosa (superior) y pasarla a un tubo eppendorf nuevo.
- Agregar acetato de sodio 3M pH 5.5 20 μ L (1 volumen) y 500 μ L de etanol absoluto (2.5 volúmenes).
- Mezclar bien y precipitar 1 h a -20 °C.
- Centrifugar 10 min a 14 000 rpm, decantar el sobrenadante y secar.

- Resuspender en 60 μL de H_2O libre RNAsa.
- Hacer una dilución de 1:200 (5 μL de RNA con 995 μL de H_2O) para determinar la concentración de RNA.
- Guardar el RNA a a -20°C .
- La integridad del RNA se verificó en gel de agarosa corrido en buffer de MOPS 1X.

5.14 Síntesis de cDNA

La síntesis del DNA complementario se realizó de la siguiente forma:

- 1.5 μL de la mezcla de dNTPs (10mM)
- 0.2 μL del Oligonucleotido R-rhIABR (2 pmoles totales)
- 4 μL del RNA de la cepa PAO1 (493 ng/ μL)
- 6.75 μL de H_2O (Libre de RNAsas Marca Gibco)

Calentar a 65°C durante 5 min y enfriar en hielo durante 1 min.

Centrifugar 1 min a 14 000 rpm y agregar los siguientes componentes:

- 4 μL del buffer de First strand 5X
- 2 μL 0.1 M DTT

Incubar a 42°C durante 2 min la mezcla de reacción y agregar:

- 1.1 μL de SuperScript™ II RT (200 U/ μL)

Incubar a 42°C durante 50 min, posteriormente inactivar la reacción calentando a 70°C durante 15 min.

5.15 Reacción de PCR.

Posteriormente de la mezcla de reacción para la síntesis de cDNA se toman 2 μL para llevar a cabo la reacción de PCR y determinar si *rhIR* esta formando un operón con los genes *rhIAB*, preparándose las muestras de reacción como se muestra a continuación:

- 10 μL del Buffer Phusion HF 5X
- 1 μL del Oligonucleótido rhlA -76 (10 μM)
- 1 μL del Oligonucleótido R-RhlABR(10 μM)
- 2 μL del cDNA obtenido
- 1.2 μL de la mezcla de dNTPs (10mM)
- 32.5 μL de H_2O (grado millipore)
- 0.5 μL de Phusion Hot start DNA polimerasa (2 U/ μL)

Posteriormente la mezcla de reacción se trasfiere al termociclador utilizándose los parámetros que se muestran a continuación:

| Segmento | Ciclos | Temperatura | Tiempo |
|----------|--------|-------------|---------|
| 1 | 1 | 98°C | 2 min |
| 2 | 33 | 98°C | 30 seg |
| | | 58.5 °C | 30 seg |
| | | 72°C | 1.5 min |
| 3 | 1 | 72°C | 10 min |

Al finalizar los ciclos, la mezcla de reacción se corrió en un gel de DNA para determinar la presencia del amplicón que abarca a los genes *rhlABR*. Para confirmar que las muestras de RNA no están contaminadas con DNA se realizó la reacción de PCR, de una mezcla de reacción a la cual no se le adicionó la transcriptasa reversa.

Capítulo 6

RESULTADOS

6.1 Vfr activa directamente la transcripción *rhIR*.

Anteriormente Medina y colaboradores propusieron que el gen *rhIR* está bajo el control de la proteína Vfr porque una fusión transcripcional *rhIR'*-*lacZ* que contiene los cuatro promotores reportados, presentó una disminución en su expresión cuando se transfiere a una mutante en el gen *vfr* en *P.aeruginosa* [Medina *et al.*, 2003]. Sin embargo, no determinaron si este efecto era una consecuencia directa de la unión de Vfr a la región promotora de *rhIR* o un efecto indirecto, debido a que Vfr activa la transcripción *lasR*, y el complejo LasR/3O-C₁₂-HSL a su vez activa directamente la transcripción de *rhIR* [Latifi *et al.*, 1996; Fuchs *et al.*, 2010].

Los resultados anteriormente descritos nos llevan a postular que la proteína Vfr podría activar de forma directa la transcripción de *rhIR*.

Para determinar si Vfr activa la transcripción de *rhIR* de manera directa, se midió la activación dependiente de Vfr de una fusión transcripcional *rhIR'*-*lacZ* que contiene los cuatro promotores de *rhIR* y se localiza en el cromosoma de una cepa de *E. coli* mutante en *crp*, (TGC000) ya que se ha demostrado que la mutación en *crp* se complementa con Vfr y con el fin de evitar una posible interferencia de CRP ya que previamente se reportó que Vfr puede producir heterodímeros inactivos con CRP, y estos heterodímeros podrían interferir con la correcta interpretación de los resultados [West *et al.*, 1994].

Los resultados obtenidos muestran que Vfr activa directamente la transcripción *rhIR* en el fondo genético de *E. coli*. (Tabla 5). Por lo tanto este hallazgo sugiere que Vfr interacciona directamente con la región promotora de *rhIR* a través de su unión a VBS, que previamente se ha encontrado que tiene una secuencia similar a la caja de unión para CRP.

Tabla 5. Activación de la fusión transcripcional (*rhIR'-lacZ*) por la proteína Vfr.

| Cepa | Expresión de la fusión transcripcional (<i>rhIR'-lacZ</i>) unidades Miller | |
|--------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| TGC000 | Vector vacío (pMMB66EH) | Vector de expresión de Vfr (pWMP28) |
| | 83 ± 43 | 225 ± 32 |

6.2 Identificación de los sitios de unión para Vfr en la región regulatoria de *rhIR*

Debido a que se encontró que Vfr activa directamente la transcripción de *rhIR* el siguiente paso a realizar es la identificación del sitio al cual se une en la región regulatoria de *rhIR*. Para lograr este objetivo se realizó un análisis bioinformático de la región regulatoria de *rhIR* utilizando la secuencia consenso de unión para Vfr [Kanack *et al.*, 2006].

El análisis bioinformático nos permitió identificar cuatro probables sitios imperfectos de unión para Vfr (VBS1-VBS4) (Fig. 26) que no fueron detectados en un análisis bioinformático previo [Kanack *et al.*, 2006], debido a que los sitios VBS2-VBS4 se encuentran dentro de la región codificante de *rhIB* y únicamente el estudio anterior realizó una búsqueda en las regiones intergénicas.

Con la finalidad de probar la funcionalidad de los probables sitios de unión para Vfr (VBS1-VBS4), se construyeron mutaciones puntuales que eliminaron cada uno de los probables sitios de unión para Vfr en el plásmido pPCS1002 (el cual presenta la fusión transcripcional *rhIR'-lacZ* que contiene a los cuatro promotores reportados) y se analizó su expresión en la cepa silvestre PAO1.

Los resultados de estos experimentos muestran que tres probables sitios de unión para Vfr (VBS1, VBS2 y VBS3) son funcionales, y que tienen un efecto positivo sobre la expresión de *rhIR*, siendo el VBS1 el que presenta el mayor efecto en la expresión de *rhIR* (Tabla 6).

Tabla 6. Importancia de los VBS en la expresión de *rhIR*.

| Plasmido | Vfr Secuencia Consenso | |
|----------|----------------------------------------|--------------------------------------|
| | WWTGNGAWNY:AGWTCACAT | |
| | Secuencias Probables de Unión para Vfr | Actividad de B-Gal (Unidades Miller) |
| pPCS1002 | | 25427 ± 3955 |
| pPGC2001 | AAGGCTGCGC:GCTTGACAG | 5600 ± 2080 |
| | -----:----TTG-- | |
| pPGC2002 | TCCTGAACGG:TGCTGGCAT | 16745 ± 2963 |
| | -----:-----TGT- | |
| pPGC2003 | TGGTCGAACG:TTGTCATAG | 14300 ± 2178 |
| | -----:----TT-T- | |
| pPGC2004 | ATTGTCACA-:ACCGCACAG | 25181 ± 2588 |
| | -----:-----TGT- | |

Para confirmar los resultados observados en *P. aeruginosa* con respecto a la unión de Vfr a los VBS1 y VBS2. Se analizó la expresión del promotor de *rhIR* que se encuentra insertado en el cromosoma de *E.coli* y presenta las mismas mutaciones en los VBS1 y VBS2 que se estudiaron en *P. aeruginosa*, en presencia del plásmido pWNP28 que expresa a la proteína Vfr. Los resultados obtenidos muestran que el VBS1 es importante para la expresión de *rhIR* en *E.coli* y que la inactivación del VBS2 no presenta un efecto significativo en la expresión de *rhIR* (Fig. 24).

Estos resultados confirman que Vfr activa directamente la transcripción de *rhIR* y que el efecto más importante en la activación de la expresión de este gen es a través de la interacción de Vfr con el VBS1, lo cual puede ser explicado por el hecho de que este VBS se encuentra a la distancia óptima (-43 nt del sitio de inicio de la transcripción del promotor 1) para funcionar como sitio de activación de la transcripción de *rhIR* en comparación con el VBS2 que se localiza a -92 nt del sitio de inicio de la transcripción del promotor 1.

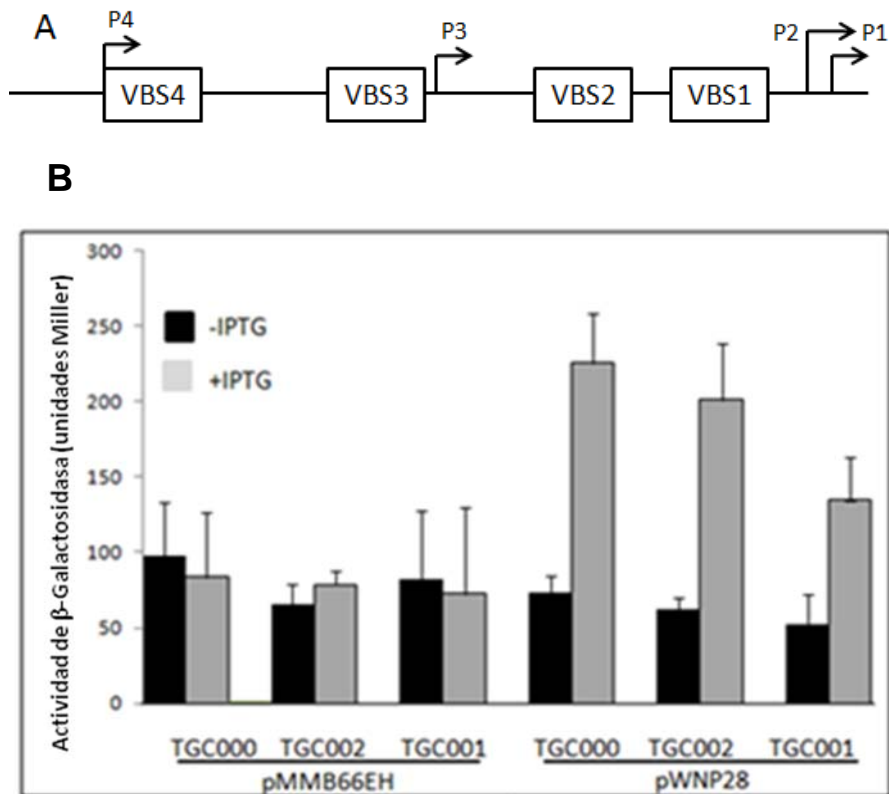


Figura 24. Vfr activa la expresión de *rhIR* a través de la unión al VBS1. (A) Representación esquemática, no a escala de la región reguladora de *rhIR* analizada. (B) Actividad de β -galactosidasa de la región reguladora silvestre de *rhIR* (TGC000), o de la misma región reguladora pero con las mutaciones puntuales que inactivan al VBS1 (TGC001) o VBS 2 (TGC002) en presencia de Vfr (pWNP28) o el vector vacío (pMMB66EH) como control. Los cultivos se crecieron en medio LB hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.4, posteriormente se incubaron con IPTG 1mM durante 90 min antes de analizar la actividad de β -Galactosidasa.

Debido a que se encontró que el VBS4 no participa en la activación de la expresión de *rhIR* y adicionalmente este sitio de unión para Vfr se localiza río abajo del promotor 4 de *rhIR* se exploró la posibilidad de que el VBS4 pudiera participar regulando de forma negativa la expresión de *rhIR*.

Para estudiar el efecto de este sitio de unión en la represión de la transcripción de *rhIR* se construyó al plásmido pPGC2008 que contiene al promotor 4 y al VBS4 fusionados con el gen reportero *lacZ* y al plásmido pPGC2008-1 en el que se introdujeron tres mutaciones puntuales para eliminar en el VBS4 los oligonucleótidos necesarios para su reconocimiento por Vfr.

Como se puede observar en la figura 25 se encontró que la inactivación del VBS4 da lugar a un incremento en la expresión de *rhIR* cuando el plásmido pPGC2008-1 se introdujo en la cepa silvestre PAO1 y la fusión transcripcional en el plásmido

pPGC2008 incrementa su expresión en una mutante en el gen *vfr* en comparación con la cepa silvestre.

Estos resultados muestran que el VBS4 es reconocido por Vfr, y la unión de esta proteína provoca la represión de la expresión del promotor 4 de *rhIR* lo que puede ser explicado por la posición del VBS4 (+10 nt) con respecto al sitio de inicio de la transcripción del promotor 4, que es característica de sitios de unión que son reconocidos por reguladores transcripcionales que funcionan como represores cuando se encuentran unidos en estos sitios (Fig. 25).

Es importante mencionar que el nivel de expresión a partir del promotor 4 de *rhIR* en el plásmido pPGC2008 es muy bajo en comparación con la expresión de los cuatro promotores de *rhIR* que se encuentran en el plásmido pPCS1002, por lo cual el efecto de Vfr como represor a través de la unión al VBS4 no puede ser detectado en el contexto de la región regulatoria que se encuentra presente en el plásmido pPCS1002 (Tabla 6).

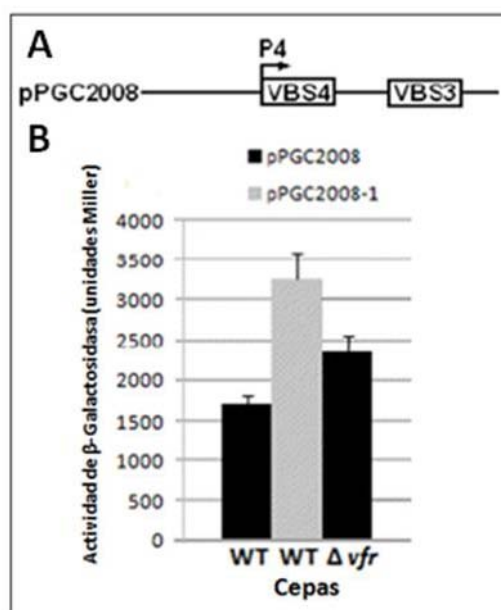


Figura 25. Vfr reprime la expresión de *rhIR* a través de la unión al VBS4. (A) Representación esquemática, no a escala de la región regulatoria de *rhIR* que muestra al promotor 4 junto con los probables sitios de unión para Vfr 3 y 4 (VBS3 y VBS4). (B) La figura muestra la expresión de la fusión transcripcional que contiene a los promotores 3 y 4 de *rhIR* (plásmido pPGC2008) en la cepa silvestre PAO1 y su mutante isogénica en el gen *vfr*, y la expresión del plásmido pPGC2008-1 que contiene la misma región de DNA, pero con las mutaciones puntuales que inactivan al VBS4 secuencia en la cepa silvestre PAO1.

6.3 Las secuencias de unión para LasR se sobrelapan con los VBS1 y VBS2

Previamente se había descrito que el complejo LasR/3O-C₁₂-HSL activa la transcripción de *rhIR* en el fondo genético heterólogo de *E. coli*, posteriormente cuando Medina y colaboradores analizaron la región regulatoria de *rhIR* en búsqueda de sitios de unión para LasR encontraron dos posibles sitios de unión, la caja *las1* y la caja *las2* [Medina *et al.*, 2003b; Latifi *et al.*, 1996].

La caja *las1* se encontraba centrada a -42 nt del sitio inicio de la transcripción del promotor 1 y se propuso que era la caja responsable de la unión y activación de la transcripción de *rhIR* dependiente de LasR, mientras que la supuesta caja *las2* encontrada a -146 nt del sitio inicio de la transcripción del promotor 4 presentaba un efecto negativo en la transcripción de *rhIR* [Medina *et al.*, 2003b].

Por otra parte cuando se estudió *in vivo* la unión del complejo LasR/3O-C₁₂-HSL al DNA por inmuno-precipitación de la cromatina, se describió una tercera caja *las* ubicada a -87 nt del sitio inicio de la transcripción del promotor 1 en donde se propuso que esta caja *las3* era el sitio de interacción del complejo LasR/3O-C₁₂-HSL para la activación de *rhIR*, aunque esta propuesta no ha sido validada experimentalmente [Gilbert *et al.*, 2009].

Cuando se analizó en este trabajo la región regulatoria de *rhIR* en búsqueda de posibles sitios de unión para Vfr se encontró que el VBS1 se sobrelapaba con la caja *las1* y que el VBS2 compartía algunas bases con la caja *las3* (Fig. 26).

```

-499 GCAGCGCGCCTACGCGCCACTGGGAGCCTTGCTGCCATCGTGCGCCGGGCTGGTCCATCCGGGCGGTATCGGCGCCATGA
                                     las box 2
-419 GCCTAGCCTTGGCGGCGGGGGTGCCGAGGTGCTGCTGCCCTGTGCCCCACGACCAGTTCGACAATGCCGAACGGCTGGTC
-339 CGGCTCGGCTGCGGGATGCGCCTGGGCGTGCCGTTGCGCGAGCAGGAGTTGCGCGGGGCGCTGTGGCGCTTGCTCGAGG
                                     T4 → VBS 4
-259 ACCGGCCATGGCGGCGGCGCTGTCGGCGTTTCATGGAATTGTGACAACCGCACAGTATCGCTTGCGGTAAGCGGCCACGG
                                     VBS 3 T3 → VBS 2 las box 3
-179 TGGTCTGAACGTTGTATAGGGAGGGGGATGCTCGATGGCTGAAGGCTGCGTCCCTGAACGGTGCTGGCAAAACAGATAGGG
                                     VBS 1 T2 → T1 →
-99 TTGCCATGATTTTGCCGTATCGGCAAGGCTGCGCGCTTGACAGCGTCATACCCCGGGCCAATTCTGCTGTGATGCATTTTATC
                                     las box 1
-16 GATCAGGGCTACTGCAATGAGGATGACGAGGCTTTTGTGCTGGTGGGACGTTGCGTATGCGAGATGTC

```

Figura 26. Secuencia nucleotídica de la región regulatoria de *rhIR*. La numeración es relativa al codón de inicio de la traducción de *rhIR* el cual es indicado en gris al igual que el codón de término de *rhIB*. Los sitios de inicio de la transcripción se indican en negritas, cursivas y con una flecha. Los nucleótidos que conforman a las cajas *las* se encuentran subrayados. Los sitios de unión para Vfr (VBS) se indican mediante una caja.

6.4 Efecto de la mutación de los VBS1 y VBS2 en la activación de *rhIR* por LasR/3O-C₁₂-HSL

Para determinar si las mismas secuencias que forman a los VBS1 y VBS2 son reconocidas tanto por Vfr como por el complejo LasR/3O-C₁₂-HSL, las mutaciones puntuales que eliminan a los VBS1 y VBS2 fueron utilizadas para determinar la activación de las fusiones *rhIR'-lacZ* localizadas en el cromosoma de *E. coli*, (TGC001 y TGC002 que eliminan respectivamente a los VBS1 y VBS2) por el complejo LasR/3O-C₁₂-HSL.

Es importante señalar que estas mutaciones se localizan en las posiciones que han sido reportadas como no esenciales para la unión de LasR/3O-C₁₂-HSL al DNA, [Soberón-Chávez *et al.*, 2005].

Contrario a lo esperado la figura 27 muestra que en el fondo heterólogo de *E. coli* las secuencias de DNA que están involucradas en la unión de Vfr (VBS1 y VBS2) también participan en la activación de la expresión de *rhIR* por el complejo LasR/3O-C₁₂-HSL (Fig. 27). Estos datos muestran que la caja *las1* y la caja *las3* son funcionales y que las dos cajas *las* son importantes en la activación de *rhIR* dependiente de LasR/3O-C₁₂-HSL.

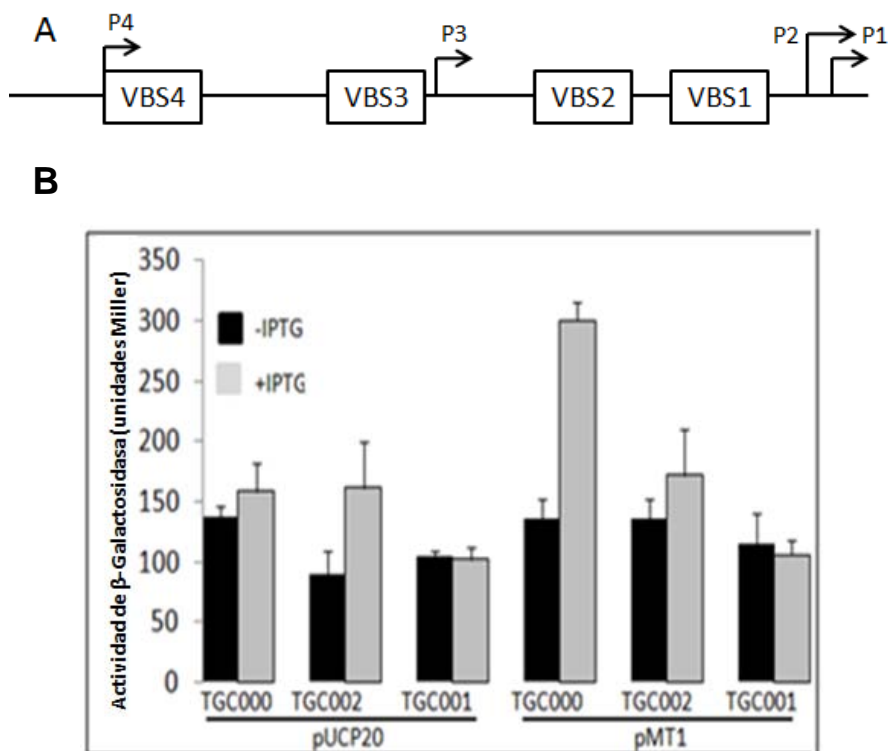


Figura 27. LasR activa la expresión de *rhIR* a través de la unión al VBS1 y al VBS3. (A) Representación esquemática, no a escala de la región regulatoria de *rhIR* analizada. (B) Actividad de β -Galactosidasa de la región regulatoria silvestre de *rhIR* (TGC000), o de la misma región regulatoria pero con las mutaciones puntuales que inactivan al VBS1 (TGC001) o VBS2 (TGC002) en presencia de LasR (pMT1) o el vector vacío (pUCP20) como control. Los cultivos se crecieron en medio LB hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0.4, posteriormente se incubaron con IPTG 1mM durante 90 min antes de analizar la actividad de β -Galactosidasa.

Hasta este momento los resultados obtenidos en *E. coli* donde se analiza el papel de los VBS1 y VBS2 con respecto a la activación de *rhIR*, se han interpretado principalmente con base en la interacción de estas secuencias de DNA con Vfr de la siguiente manera: la mutación del VBS1 afecta tanto la activación de *rhIR* dependiente de la proteína Vfr como la dependiente de LasR/3O-C₁₂-HSL y la mutación en el VBS2 de manera inesperada únicamente afecta al reconocimiento por el complejo LasR/3O-C₁₂-HSL.

Como se mencionó anteriormente las mutaciones en los VBS1 y VBS2 se localizan en las posiciones que han sido reportadas como no esenciales para la unión de LasR/3O-C₁₂-HSL, por lo cual con la finalidad de determinar si la completa inactivación de las cajas *las1* y *las3* tiene algún efecto sobre la expresión de *rhIR* y confirmar en *P. aeruginosa* que LasR/3O-C₁₂-HSL reconoce a estas cajas *las* se realizó la mutación del nucleótido invariable C en la posición 3 de las dos cajas *las*. Esta mutación se realizó en el fondo de los plásmidos que llevan previamente inactivados a los VBS1 y VBS2 (plásmidos pPGC2005 y pPGC2006).

Los resultados muestran que el efecto de la inactivación de las secuencias de unión para Vfr y LasR es aditivo (Tabla. 7), lo que confirma que la interacción de los dos reguladores transcripcionales en este sitio de unión es importante para la activación de *rhIR*.

En el caso particular del VBS2 se documentó que a pesar que las mutaciones en este sitio de unión afectan únicamente al reconocimiento por LasR en el fondo de *E. coli*, al inactivar al nucleótido conservado C la actividad de β -Galactosidasa de esta fusión transcripcional disminuye de forma importante en *P. aeruginosa* (Tabla. 7), lo que indica que al inactivar los nucleótidos no esenciales de la caja *las3* esta caja sigue siendo reconocida por el complejo LasR/3O-C₁₂-HSL.

Adicionalmente se analizó el papel que juega la caja *las2* en la regulación transcripcional de *rhIR* en el fondo genético *P. aeruginosa*. Por lo cual se realizaron mutaciones puntuales que eliminaban a la caja *las2* y se determinó la actividad de

β -Galactosidasa promovida por el plásmido pPGC2008-2 (caja *las2*) en la cepa silvestre PAO1. En este fondo genético no se encontró alguna diferencia significativa en la expresión de *rhIR*, para confirmar este resultado se analizó también la actividad de β -Galactosidasa promovida por el plásmido silvestre pPGC2008 en la cepa silvestre PAO1 y en una cepa mutante en el gen *lasR* (Fig. 28) de nueva cuenta no se encontró un cambio en la actividad de β -Galactosidasa. Por lo tanto estos resultados muestran que LasR es incapaz de reprimir la expresión de *rhIR*, a través de la unión a la caja *las2* y que el único efecto que presenta LasR sobre *rhIR* es el de activar su expresión.

Tabla 7. Importancia de las cajas *las1* y *las3* en la expresión de *rhIR*.

| | Vfr | Secuencia | Consenso | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------|--|
| | | WW | TGNGAWNY :AGW TCACAT | |
| Plásmido | Secuencias Probables de Unión para Vfr^a | | Actividad de β-Gal (Unidades Miller) | |
| | AAG GCTG CGC:GCT TGACA G | | | |
| pPGC2001 | -----:----TTG-- | | 5600 \pm 2080 | |
| | AAG GCTG CGC:GCT TGACA G | | | |
| pPGC2005 | ---T-----:----TTG-- | | 2836 \pm 783 | |
| | TC CTGAA CGG:TG CTGGCA T | | | |
| pPGC2002 | -----:-----TGT- | | 16745 \pm 2963 | |
| | TC CTGAA CGG:TG CTGGCA T | | | |
| pPGC2006 | -----:--T--TGT- | | 5969 \pm 1506 | |

^aLas secuencias que corresponden a los nucleótidos invariables CT-N₁₂-AG de las cajas *las* se muestran en cursivas y subrayados.

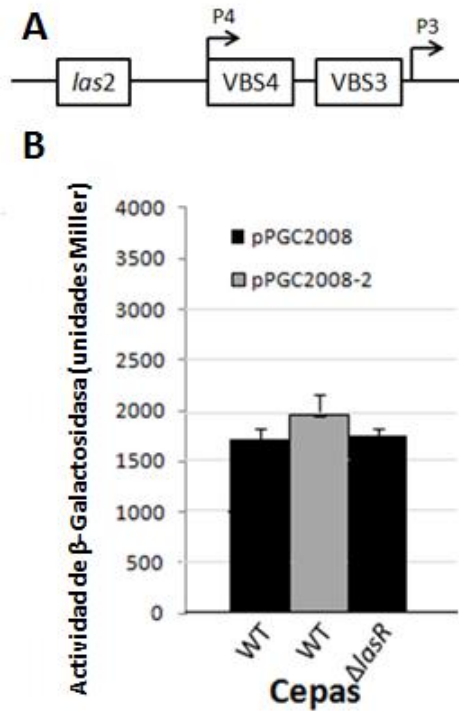


Figura 28. LasR es incapaz de reprimir la expresión de *rhIR* a través de su unión con la caja *las2*. (A) Representación esquemática, no a escala de la región reguladora de *rhIR* que muestra a la caja *las2* y a los promotores 3 y 4 junto con sus VBS3 y VBS4. (B) La figura muestra la actividad de β -galactosidasa de la cepa silvestre PAO1 que contiene a los plásmido pPGC2008 y pPGC2008-2, así como a la mutante isogénica en el gen *lasR*, que contiene únicamente al plásmido silvestre pPGC2008. Las bacterias se crecieron en medio PPGAS hasta que alcanzaron una $DO_{600\text{ nm}}$ de 1.5, en este punto se tomaron alícuotas y la actividad de β -Galactosidasa fue analizada.

En resumen los resultados obtenidos muestran que existen cuatro sitios de unión para Vfr en la región reguladora de *rhIR*, dos de los cuales (VBS1 y VBS2) tiene un efecto positivo en la expresión de *rhIR* y se encuentran parcialmente sobrelapados con las cajas *las1* y *las3* (Fig. 26). Los resultados de esta tesis muestran que estas secuencias de DNA están involucradas tanto en la regulación de *rhIR* dependiente de LasR como en la dependiente de Vfr y que estos dos reguladores transcripcionales presentan un efecto sinérgico sobre la regulación de *rhIR* (Tablas 6 y 7).

6.5 RhIR se autorregula positivamente a través de la expresión del promotor de *RhIA*

El análisis de la secuencia regulatoria localizada río arriba del sitio de inicio de la traducción de *rhIR* muestra que varios de los elementos reguladores implicados en el control de la expresión de este gen se encuentran dentro de la región codificante del gen *rhIB* y que no hay secuencias aparentemente involucradas en la terminación de la transcripción de *rhIB*. A su vez *rhIB* se transcribe a partir del promotor de *rhIA*, y este promotor es activado por el complejo RhIR/C₄-HSL. Esta estructura nos llevó a proponer la hipótesis de que *rhIR* podría ser transcrito a partir de los cuatro promotores descritos que se han estudiado con plásmidos o del promotor de *rhIA* formándose el operón *rhIABR* que produce un bucle positivo de autorregulación. Para probar esta hipótesis se utilizó una mutante en el gen *rhIR* por inserción de un transposón que tiene una fusión *lacZ* dentro de marco (PW6882) y se expresó RhIR en *trans* a partir del plásmido pGMYC. Los resultados muestran (Fig. 29) que la expresión de *rhIR* se incrementa dos veces por la expresión de la proteína RhIR, demostrando que RhIR autorregula positivamente su expresión. La sobreexpresión de LasR o Vfr, tienen también un efecto positivo sobre la expresión de *rhIR*, pero este efecto no es tan alto como el observado con RhIR, lo que sugiere que la autorregulación positiva de RhIR juega un papel importante en la expresión *rhIR*.

También es necesario señalar que la introducción de la mutación en el gen *vfr* en la cepa PW6882 (PAO1-WV) reduce la expresión de *rhIR* (Fig. 29), pero no causan su completo silenciamiento, lo que sugiere que la expresión del promotor 4 el cual es reprimido por Vfr puede conducir la expresión de *rhIR* en ciertas circunstancias y adicionalmente que debe existir un mecanismo de activación de la expresión de *rhIR* independiente de Vfr y por lo tanto de LasR (debido a que *lasR* no se expresa en una mutante en el gen *vfr*).

Con la finalidad de demostrar que RhIR activa su transcripción a través de activar la transcripción del gen *rhIA* se realizó un ensayo de RT-PCR, para confirmar que *rhIR* forma parte del operón *rhIABR*. Los resultados obtenidos (Fig. 30a) confirman que *rhIR* forma un operón con los genes *rhIA* y *rhIB*, y por lo tanto puede activar su propia transcripción induciendo la expresión del gen *rhIA*.

Anteriormente se documentó que una mutante en el gen *rhIA* obtenida por inserción de un cassette de gentamicina producía cantidades reducidas de piocianina, pero esta observación no fue entendida en su momento. El efecto polar en la expresión *rhIR* de

la inserción de un cassette de gentamicina en *rhIA* podría causar una reducción en la expresión de RhIR y por lo tanto una reducción en la producción de pirocianina. Para probar esta hipótesis se determinó si la mutante en *rhIA* contenía una concentración reducida de la proteína RhIR. Los resultados obtenidos confirmaron la predicción (Fig. 30b), lo que apoya la existencia de un ciclo positivo de auto-regulación en la expresión *rhIR* través de la activación del promotor de *rhIA*.

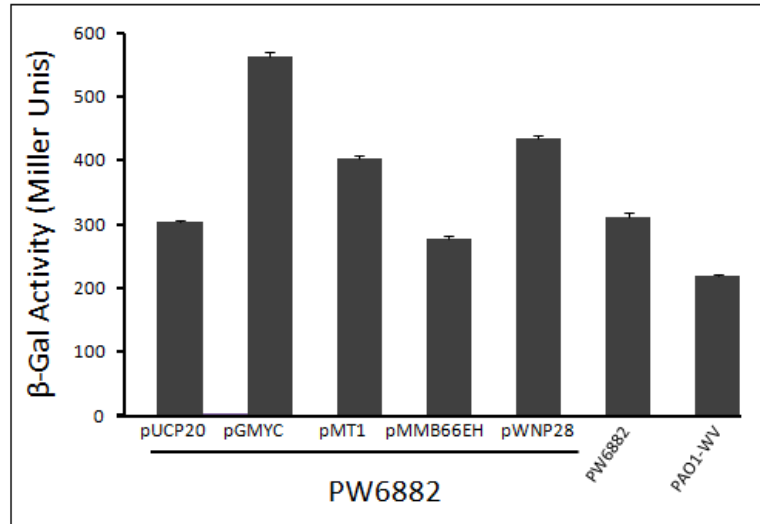


Figura 29. RhIR induce su propia expresión. La figura muestra la actividad de β -Galactosidasa de una mutante en el gen *rhIR*, que tiene una fusión en marco con *lacZ* en presencia de los plásmidos pGMYC, pMT1 y pWNP28 que expresan en *trans* a las proteínas RhIR, LasR y Vfr respectivamente. Las bacterias se crecieron en medio PPGAS hasta que alcanzaron una $DO_{600\text{ nm}}$ de 1.5, en este punto se tomaron alícuotas y la actividad de β -galactosidasa fue analizada.

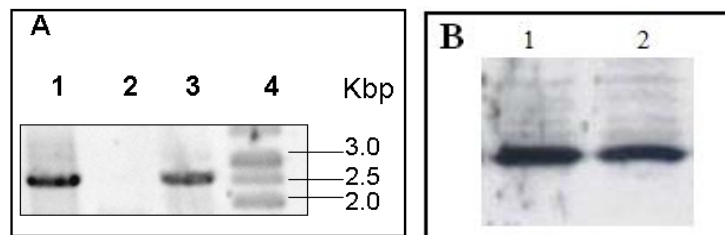


Figura 30. *rhIR* forma un operón con los genes *rhIA* y *rhIB*. El tamaño esperado para el operón de *rhIABR* es de 2.51 Kbp (A) El carril 1 corresponde al producto de PCR obtenido del DNA cromosomal de la cepa PAO1 como templado. El carril 2 corresponde al control negativo que consiste de RNA purificado de células de PAO1 crecidas en medio PPGAS hasta una $D.O_{600\text{ nm}}$ de 1.5 e incubado en las condiciones utilizadas para realizar el RT-PCR, pero en ausencia de transcriptasa reversa. El carril 3 corresponde al producto de PCR obtenido usando como templado al cDNA obtenido del RNA de la cepa PAO1. El carril 4 corresponde al marcador de peso molecular.

(B) Efecto de la mutación en *rhIA* en la concentración de proteína de RhIR determinada por Western blot. El carril 1 corresponde a la concentración de RhIR en la cepa silvestre PAO1. El carril 2 corresponde a la concentración de RhIR en la cepa mutante en el gen *rhIA*.

Capítulo 7

DISCUSIÓN GENERAL

En años recientes la actividad de investigación bacteriológica sobre *P.aeruginosa* ha estado orientada al mejor entendimiento de su fisiología, debido a que a pesar de los poderosos antibióticos con los cuales se cuenta actualmente, *P.aeruginosa* continúa siendo una de las principales causas de mortalidad de pacientes hospitalizados que fueron dañados por una cirugía o que se encuentran inmunocomprometidos, por lo cual la investigación sobre esta bacteria resulta muy útil no solo para proteger la salud de los pacientes hospitalizados, sino también para mejorar las finanzas de los sistemas de salud. Por lo cual resulta muy importante el desarrollo de nuevos antibióticos o productos de control biológico, y es imperativo para lograr este fin un conocimiento detallado de la fisiología microbiana de esta bacteria.

Por otro lado a pesar de la relevante contribución de los sistemas de QS dependientes de AHL en la virulencia de *P.aeruginosa*, frecuentemente se aíslan mutantes en el gen *lasR* en cepas de *P.aeruginosa* de origen clínico o ambiental [Smith *et al.*, 2006], esto lleva a preguntarse hasta que punto la jerarquía en los sistemas *las* y *rhl* es dependiente de las condiciones ambientales y del medio en el cual están creciendo las bacterias. De hecho se encontró que la expresión de *lasR*, *lasI*, *rhlI* y *rhlR* varía ampliamente en diferentes condiciones de cultivo encontrándose la mayor expresión en medio mínimos y medios ricos diluidos en comparación con medios ricos. En ciertas condiciones la activación del sistema *las* precedía a la del sistema *rhl*, mientras que en otras el sistema *rhl* se activaba de forma más temprana que el sistema *las*. Lo que estos datos sugieren es que la jerarquía de los sistemas *las-rhl* es en ocasiones dependiente del medio de cultivo [Duan y Surette, 2007].

Aunado al hecho de que recientemente se descubrió que en la cepa de *P. aeruginosa* PUPa3 aislada de la rizosfera del arroz, los dos sistemas de QS dependientes de AHL, no se encuentran organizados de forma jerárquica y que ambos son importantes para la colonización de la rizosfera [Steindler *et al.*, 2009].

En este trabajo se construyeron fusiones transcripcionales *rhIR'-lacZ* que fueron introducidas en un huésped heterólogo como *E.coli* y se explotó el hecho de que en este fondo genético se podría elucidar, si LasR/3O-C₁₂-HSL o Vfr puede activar directamente la expresión de *rhIR*, ya que se elimina la presencia de otras interacciones que existen en la red regulatoria de *P.aeruginosa*. Los resultados obtenidos del análisis de la expresión de *rhIR* en *E.coli* mostraron que Vfr activa

directamente la transcripción de *rhIR*, lo que posiciona a Vfr como el regulador transcripcional que podría activar la expresión de *rhIR* en ausencia de LasR, y se podría explicar porque en la cepa PAO1 de *P.aeruginosa* que es un aislado de origen clínico la jerarquía de los sistemas *las* y *rhl* en ocasiones se rompe, y porque se pueden aislar cepas de *P.aeruginosa* de pacientes con FQ, mutantes en el gen *lasR* y que poseen la capacidad de ocasionar problemas neumológicos, Por otro lado es tentador suponer que en la cepa PUPa3, la proteína Vfr es la proteína responsable activar de la expresión de *rhIR*, debido a que en esta cepa LasR no regula la transcripción de *rhIR*, y que los VBS1-VBS4 que se describieron que son funcionales para el reconocimiento por Vfr se encuentran conservados en la región regulatoria de *rhIR* en la cepa PUPa3 [Steindler *et al.*, 2009].

El promotor de *rhIR* es complejo, ya que presenta cuatro promotores en donde las proteínas Vfr, LasR y RpoN (factor sigma 54) controlan la transcripción de este gen.

Para el caso de la proteína Vfr se determinó que activa de forma directa la transcripción de *rhIR* a través de la unión a los VBS1-VBS3, al respecto es tentador proponer que Vfr se une a estos VBS y activa la transcripción de *rhIR* en ausencia de AMPc al igual que lo hace para *lasR*, ya que si la activación de *lasR* es llevada a cabo por Vfr en ausencia de AMPc con la finalidad de sintetizar únicamente los factores de virulencia dependientes de QS y evitar la producción de los factores de virulencia dependientes de AMPc, sería lógico pensar que la activación de *rhIR* que forma parte del sistema de QS también se lleva a cabo en ausencia de AMPc por Vfr [Fuchs *et al.*, 2010].

Al analizar la región regulatoria de *rhIR* se encontró dos probables sitios de unión para Vfr (VBS1 y VBS2) que se sobrelapan con las cajas *las1* y *las3*, los cuales al mutarlos para que no sean reconocidas por Vfr (en las posiciones que han sido reportadas como no esenciales para la unión de LasR), también afectan al reconocimiento de las cajas *las* por LasR, aunque estas podrían seguir siendo reconocidas con una menor eficiencia, estos resultados son en cierta forma reminiscentes a los obtenidos para la caja *lux* de *V.fischeri* en donde las bases adyacentes a los nucleótidos conservados son importantes para la función de la caja debido a que funcionan como DNA espaciador que no interacciona directamente con el factor transcripcional, pero después de la unión del regulador transcripcional esta región sufre una distorsión que es importante para la alta afinidad de unión del complejo LasR-DNA [Antunes *et al.*, 2008].

También se encontró que solamente después de eliminar el nucleótido invariable C, se pierde de manera total el reconocimiento de estas cajas por LasR.

Además de su unión al VBS1, Vfr activa la expresión de *rhIR* por medio del reconocimiento del VBS3 que estaría regulando al promotor 3. En un estudio previo por Medina *et al.*, 2003b se describió que una mutante en el gen *rpoN*, presenta una disminución de la expresión de *rhIR* dependiente de los promotores 1 y 3, lo que se puede explicar con base en el hecho de que RpoN es fundamental para la activación de la expresión de *vfr*, por lo cual en una mutante en el gen *rpoN*, la expresión de *vfr* que se presenta únicamente es la basal aunado a que en este estudio se demostró que Vfr activa la expresión de *rhIR* a través de los promotores 1 y 3 se puede inferir que el efecto de RpoN sobre *rhIR* es indirecto a través de la regulación que ejerce sobre Vfr.

El otro papel que Vfr juega como regulador transcripcional de *rhIR* es como represor de la transcripción del promotor 4 es a través de la unión al VBS4 que se encuentra río abajo del sitio de inicio de la transcripción del promotor 4, con lo cual podemos agregar a *rhIR* a la lista de genes que son regulados de manera negativa por Vfr ya que anteriormente se había reportado que Vfr funciona como represor sobre la transcripción del gen *fleQ* a través de la unión al VBS que se localiza sobre el inicio de la transcripción del gen *fleQ* [Dasgupta *et al.*, 2003].

Al analizar en conjunto el papel de Vfr sobre la regulación de *rhIR* este trabajo constituye el primer reporte de que Vfr funcione como represor y activador de la transcripción del mismo gen. Debido a que en otras bacterias Gram-negativas como *V.vulnificus*, *V.harveyi* y *V.fischeri* el homólogo de Vfr (CRP) funciona únicamente como activador de la transcripción de los genes que se encuentran regulados por QS.

Con respecto al mecanismo con el cual Vfr activa la expresión de los reguladores transcripcionales de QS, se observa que al igual que CRP de *V.fischeri* actúa como un regulador de la transcripción de los reguladores de QS. De forma contraria a lo que se observa en *V.vulnificus* y *V.harveyi* donde CRP y LuxR (homólogo de RhIR) activan de forma cooperativa la transcripción de sus genes blancos [Jeong *et al.*, 2003].

Cuando se analiza la región cromosómica en donde se localiza *rhIR* se observa que los genes *rhIA* y *rhIB* se transcriben en la misma dirección que *rhIR* lo que hace suponer que podrían formar un operón con *rhIR* debido a la ausencia de un terminador de la transcripción en el gen *rhIB*. Los resultados de este trabajo muestran que *rhIR*

forma un operón con los genes *rhIAB*, lo que agrega al promotor de *rhIA* como el quinto promotor responsable de activar la expresión de *rhIR*.

En resumen los datos obtenidos de este trabajo demuestran que las proteínas Vfr, LasR y RhIR tienen un papel en la regulación de la transcripción de *rhIR* y proponemos un modelo que integra todos estos elementos regulatorios a lo largo de la curva de crecimiento de *P. aeruginosa* (Fig. 31).

Cuando esta bacteria está creciendo a un ritmo exponencial Vfr se produce en bajos niveles [Heurlier *et al.*, 2003] y la transcripción de *rhIR* se presenta desde el promotor 2 que es constitutivo y a partir del promotor 4 (el operón *rhIAB* no se transcribe) debido a que Vfr no se encuentra unido al VBS4 con lo cual no hay represión de la transcripción del promotor 4. Durante la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria de crecimiento, aumenta la concentración de Vfr y la proteína Vfr activamente directamente y de forma simultánea la expresión de los genes *lasR* y *rhIR*. La expresión del gen *rhIR* es activada mediante la unión directa de Vfr a los VBS1-VBS3 que se encuentran en la región regulatoria de este gen. En estos momentos a pesar de que ya se ha producido la proteína RhIR esta no puede activar la expresión del operón *rhIABR* debido a que la ausencia de C₄-HSL ocasiona que RhIR se una a la caja *las* de *rhIA* y funcione como represor de la transcripción del operón *rhIABR*.

El incremento en la concentración de LasR produce la unión de este regulador transcripcional a las cajas *las1* o *las3* que se encuentran río arriba del promotor 1 de *rhIR* lo que lleva a un aumento de la expresión de este promotor y a las cajas *las* que se encuentran en los genes *lasI* y *rhII*. Cuando se alcanzan ciertas concentraciones de RhIR y C₄-HSL, el promotor de *rhIA* es activado por RhIR/C₄-HSL, lo que da lugar a la transcripción del operón *rhIABR* que a su vez conduce a una mayor expresión de *rhIR* por un bucle de autorregulación positivo, como se muestra en la figura 31.

Adicionalmente es tentador suponer que RsaL sería el regulador transcripcional responsable de reprimir la transcripción del operón *rhIABR* debido a que como se mencionó anteriormente RsaL reprime la transcripción de *lasI* lo que ocasiona una disminución de la concentración de 3-oxo-C₁₂-HSL, y por lo tanto LasR, en ausencia de su autoinductor es incapaz de activar la expresión de *rhII*, lo que da como resultado que RhIR, se una al promotor del *rhIA* en ausencia del autoinductor C₄-HSL y reprima la transcripción del operón *rhIABR* apagando el ciclo de autorregulación positiva.

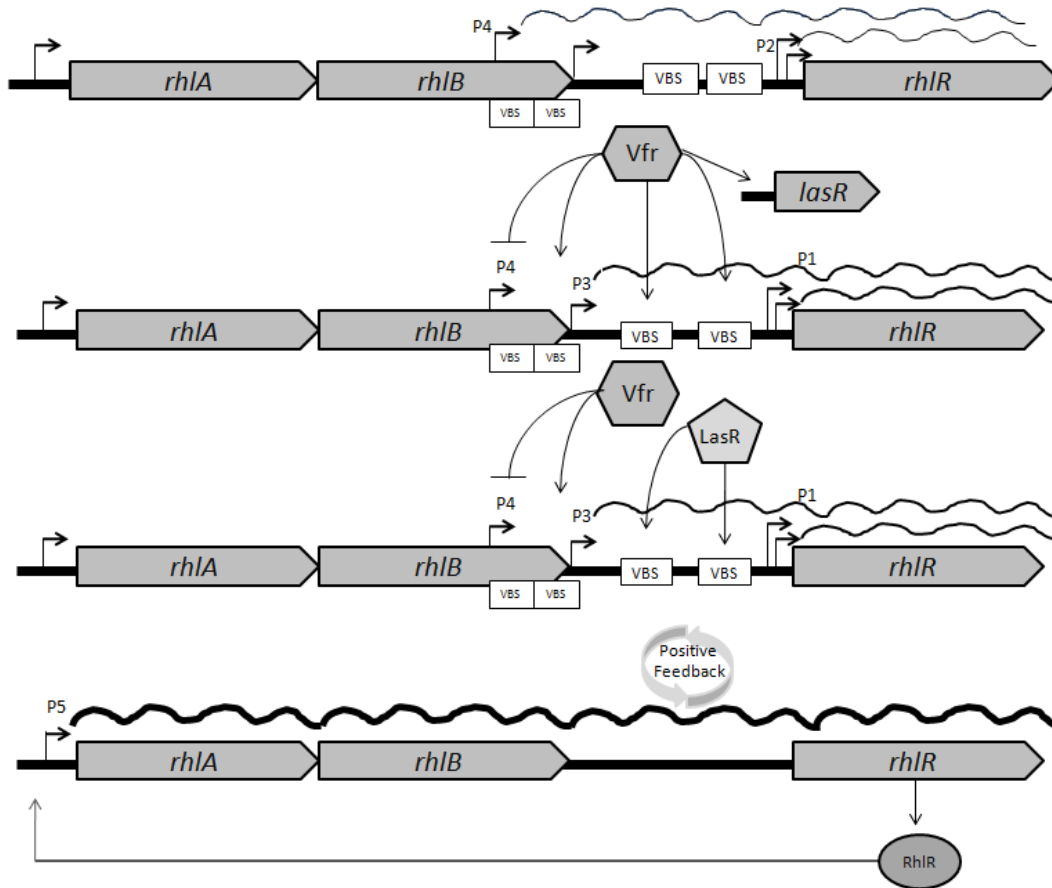


Figura 31. Representación esquemática del mecanismo de regulación transcripcional de *rhIR* en *P.aeruginosa*. En la fase exponencial de crecimiento *rhIR* se transcribe únicamente a través del promotor 4. Una vez que se ha producido Vfr, este activa la transcripción de *rhI* y *lasR* al mismo tiempo, a la vez que reprime al promotor 4 de *rhIR*. Alcanzados los niveles necesarios de LasR esta proteína activa la transcripción de *rhIR* a través de los promotores 1 y 2. Una vez que la proteína RhIR se produce esta última activa la transcripción de *rhIA* a partir de de su promotor y se transcribe el operón *rhIABR* formándose un bucle de autorregulación positivo.

Capítulo 8

CONCLUSIONES

- 1.-La proteína Vfr reprime la transcripción del promotor 4 de *rhIR* a través de la unión al de VBS4 que se encuentra río abajo de este promotor.
- 2.-La proteína Vfr activa la transcripción de *rhIR* a través de la unión al VBS3, que se encuentra río arriba del promotor 3, y por medio de la unión al VBS1 localizado río arriba de los promotores 1 y 2 de *rhIR*.
- 3.-En *P.aeruginosa* tanto el complejo LasR/3-oxo-C₁₂-HSL como la proteína Vfr activan de forma directa la transcripción de *rhIR*.
- 4.-La proteína RhIR autorregula de forma positiva su transcripción a través de la unión al promotor de *rhIA* lo que da como resultado que *rhIR* se transcriba como un operón como genes *rhIA* y *rhIB*.
- 5.-La activación de la cascada regulatoria de quorum sensing es a través de bucles de autorregulación positiva.

Capítulo 9

PERSPECTIVAS

- 1.-Determinar si en cepas ambientales de *Pseudomonas aeruginosa* Vfr activa directamente la transcripción de *rhIR*.
- 2.-Establecer el mecanismo mediante el cual se apaga la transcripción del gen *rhIR*, una vez que su regulón ya no es necesario en la fisiología de *Pseudomonas aeruginosa*.

Capítulo10

REFERENCIAS

Abdel-Mawgoud, AM., Lépine, F. & Déziel, E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol.* **86**, 1323-1336.

Adam, E. C., Mitchell, B. S., Schumacher, D. U., Grant, G. & Schumacher, U. (1997). Pseudomonas aeruginosa PA-II lectin stops human ciliary beating: therapeutic implications of fucose. *Am J Respir Crit Care Med* **155**, 2102–2104.

Alm, R. A. & Mattick, J.S. (1995). Identification of a gene, *pilV*, required for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*, whose product possesses a pre-pilin-like leader sequence. *Mol Microbiol.* **16**, 485–96.

Alm, R. A. & Mattick, J.S. (1997). Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomona. aeruginosa*. *Gene* **192**, 89-98.

Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A. & Maier, R.M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl Environ Microbiol.* **66**, 3262-3268.

Antunes, L. C., Ferreira, R. B., Lostroh, C. P. & Greenberg, E.P. (2008). A mutational analysis defines *Vibrio fischeri* LuxR binding sites. *J Bacteriol.* **190**, 4392-4397

Arora, S.K., Banger, M., Lory, S., & Ramphal, R. (2001). A genomic island in *Pseudomonas aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* **98**, 9342–9347

Baumann, U., Wu, S., Flaherty, K.M & McKay, D. B. (1993). Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif. *The EMBO Journal.* **12**, 3357-3364.

Beattie, B. K. & Merrill, A. R. (1996a). In vitro enzyme activation and folded stability of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its C-terminal peptide. *Biochemistry* **35**, 9042–9051.

Beattie, B. K., Prentice, G. A. & Merrill, A. R. (1996b). Investigation into the catalytic role for the tryptophan residues within domain III of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Biochemistry.* **35**,15134-15142.

Bera, A. K., Atanasova, V., Robinson, H., Eisenstein, E., Coleman, J. P., Pesci, E. C., Parsons, J.F. (2009). Structure of PqsD, a *Pseudomonas* quinolone signal biosynthetic enzyme, in complex with anthranilate. *Biochemistry.* **48**, 8644-8555.

Blumer, C. & Haas, D. (2000). Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch Microbiol.* **173**,170-177.

Brazas, M. D. & Hancock, R. E. (2005). Ciprofloxacin induction of a susceptibility determinant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* **49**, 3222-3227.

- Burrows, L. L. (2005).** Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol* **57**, 878-888.
- Coleman, J. P., Hudson, L. L., McKnight, S. L., Farrow, J. M 3rd, Calfee, M. W., Lindsey, C. A., Pesci, E. C. (2008).** *Pseudomonas aeruginosa* PqsA is an anthranilate-coenzyme A ligase. *J Bacteriol.* **190**, 1247-1255.
- Comolli, J.C., Hauser, A. R., Waite, L., Whitchurch, C. B., Mattick, J. S. & Engel, J.N. (1999).** *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun.* **67**, 3625-3630.
- Craig, L., Taylor, R. K., Pique, M. E., Adair, B. D., Arvai, A. S., Singh, M., Lloyd, S. J., Shin, D. S., Getzoff, E.D., Yeager, M., Forest, K.T. & Tainer, J.A. (2003).** Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin. *Mol Cell.* **11**, 1139-1150.
- Craig, L., Pique, M.E. & Tainer, J.A. (2004).** Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* **2**,363-378.
- Dasgupta, N., Ferrell, E. P., Kanack, K. J., West, S.E. & Ramphal, R. (2002).** *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is sigma70 dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol.* **184**:5240-50.
- Denning, G.M., Wollenweber, L. A., Railsback, M. A., Cox, C. D., Stoll, L. L. & Britigan, B. E. (1998).** *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun.* **66**, 5777-5784.
- Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F., and Bisailon, J. (1996).** Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1908–1912.
- Dietrich, L. E., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M. & Newman, D. K. (2006).** The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **61**,1308-1321.
- Diggle, S. P., Winzer, K., Chhabra, S. R., Worrall, K. E., Camara, M., Williams, P. (2003).** The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol* **50**, 29-43.
- Elrod, R.P. & Braun, A. C. (1942).** *Pseudomonas aeruginosa* its role as a plant pathogen. *J. Bacteriol.* **44**, 633-644.
- Engel, J. & Balachandran P. (2009).** Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol.* **12**, 61-66.
- Engel, L. S., Hobden, J. A., Moreau, J. M., Callegan, M. C., Hill, J. M. & O'Callaghan, R. J. (1997).** *Pseudomonas* deficient in protease IV has significantly reduced corneal virulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **38**, 1535-1542.
- Engel, L. S., Hill, J. M., Moreau, J. M., Green, L. C., Hobden, J.A. & O'Callaghan, R.J. (1998).** *Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **39**, 662-665.

Engebrecht, J. & Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4154–4158.

Farrow, J. M 3rd. & Pesci, E.C. (2007). Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal. *J Bacteriol.* **189**, 3425-3433.

Farrow, J. M 3rd, Sund, Z. M., Ellison, M. L., Wade, D. S., Coleman, J. P. & Pesci, E. C. (2009). PqsE functions independently of PqsR-Pseudomonas quinolone signal and enhances the rhl quorum-sensing system. *J Bacteriol.* **190**, 7043-7051.

Foght, J. M., Westlake, D. W., Johnson, W. M., & Ridgway, H. F. (1996). *Microbiology* **142**, 2333-2340.

Fox, A., Haas, D., Reimann, C., Heeb, S., Filloux, A. & Voulhoux, R. (2008). Emergence of secretion-defective sublines of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 resulting from Spontaneous Mutations in the vfr Global Regulatory Gene. *Appl Environ Microbiol.* **74**, 1902 – 1908.

Friedheim, E. & Michaelis, L. (1931). Potentiometric study of pyocyanine. *J. Biol. Chem.* **91**, 355–368.

Fuchs, E. L., Brutinel, E. D., Jones, A. K., Fulchner, N. B., Urbanowski, M. L., Yahr, T. L. & Wolfgang, M. C. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and –independent mechanisms. *J. Bacteriol* **192**, 3553–3564.

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

Fuqua, C., Parsek, M. R. & Greenberg, E.P. (2001). Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 439–68.

Gacesa, P. (1998). Bacterial progress alginate biosynthesis –recent and future prospects *Microbiology* **144**, 1133-1143.

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

Gambello, M. J & Iglewski, B.H. (1991). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene, a transcriptional activator of elastase expression. *J Bacteriol.* **173**, 3000-3009.

Garber, N., Guempel, U., Belz, A., Gilboa-Garber, N. & Doyle, R. J. (1992). On the specificity of the D-galactose-binding lectin (PA-I) of *Pseudomonas aeruginosa* and its strong binding to hydrophobic derivatives of D-galactose and thiogalactose. *Biochim Biophys Acta.* **1116**, 331-333.

Gessard, C. (1882). Sur les colorations bleue et verte des linges a` pansements. Comptes-rendus hebdomadaire des se`ances de l'Acade`mie des Sciences **94**,536–538.

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

Gilboa-Garber, N., Mizrahi, L. & Garber, N. (1972). Purification of the galactose-binding hemagglutinin of *Pseudomonas aeruginosa* by affinity column chromatography using sepharose. *FEBS Lett.* **15**, 93-95.

Gilboa-Garber, N., Katcoff, D. J. & Garber, N. C. (2000). Identification and characterization of pseudomonas aeruginosa PA-III lectin gene and protein compared to PA-IL. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **29**, 53-57.

Glick, J. & Garber, N. (1983). The intracellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *J Gen Microbiol.* **129**, 3085-3090.

Goldberg, J.B. (2000). *Pseudomonas*: global bacteria. *Trends Microbiol.* **8**, 55–57.

Gustin, J.K, Kessler, E. & 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.

Häussler, S., Nimtz, M., Domke, T., Wray, V. & Steinmetz, I. (1998). Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect Immun* **66**,1588–1593.

Harrison, F. (2007). Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. *Microbiology.* **153**, 917-923.

Hommel, R. (1994) Formation and function of biosurfactants for degradation of water-insoluble substrates. In: Ratledge C (ed) *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers, London, pp 63–87.

Howe, T. R. & Iglewski, B. H. (1984). Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in mouse eye model. *Infect. Immun.* **47**, 555-560.

Huang, J.J., Petersen, A., Whiteley, M. & Leadbetter, J. R (2006). Identification of QuiP, the product of Gene PA1032, as the second Acyl-Homoserine Lactone Acylase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* (2006). **72**, 1190-1197.

Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., Chun-Rong, L., Guenther, D., Bovee, D., Olson, M. V. & Manoil, C. (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**, 14339-14344.

Kanack, K. J., Runyen-Janecky, L. J., Ferrell, E. P., Suh, S. J. & West, S. E. (2006). Characterization of DNA-binding specificity and analysis of binding sites of the *Pseudomonas aeruginosa* global regulator, Vfr, a homologue of the *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Microbiology* **152**, 3485-3496.

Kanthakumar, K., Taylor, G. W., Cundell, D. R., Dowling, R. B., Johnson, M., Cole, P.J. & Wilson, R. (1996). The effect of bacterial toxins on levels of intracellular adenosine nucleotides and human ciliary beat frequency. *Pulm Pharmacol Ther* **9**, 223–230.

- Kaplan, H.B. & Greenberg, E. P. (1985).** Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* **163**, 1210–1214.
- Keizer, D.W., Slupsky, C.M., Kalisiak, M., Campbell, P.A., Crump, M.P., Sastry, P.A., Hazes, B., Irvin, R.T. & Sykes, B.D. (2001).** Structure of a pilin monomer from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **276**, 24186-193.
- Kessler, E. (1995).** Beta-lytic endopeptidases. *Methods Enzymol.* **248**, 740-756.
- Kessler, E., Safrin, M., Gustin, J. K. & Ohman, D. E. (1998).** Elastase and the LasA Protease of *Pseudomonas aeruginosa* are secreted with their propeptides *J Biol Chem* **273**, 30225–30231.
- Khan, N.H., Ishii, Y., Kimata-Kino, N., Esaki, H., Nishino, T., Nishimura, M., and Kogure, K. (2007).** Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. *Microb Ecol* **53**, 173–186.
- Kiratisin, P., Tucker, K.D., & Passador, L. (2002).** LasR, a transcriptional activator of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes, functions as multimer. *J Bacteriol.* **184**, 4912-4919.
- Kiewitz, C. & Tümmler, B. (2000).** Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol.* **182**, 3125-3135.
- Klockgether, J., Wurdemann, D., Wiehlmann, L., Binnewies, T.T., Ussery, D.W., & Tümmler, B. Genome (2008).** Diversity of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas genomics and molecular biology* Edited by: Cornelis P. Caister Academic Press; 19-42.
- Laughlin, R. S., Musch, M. W., Hollbrook, C. J., Rocha, F. M., Chang, E. B. & Alverdy, J. C. (2000).** The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut derived sepsis. *Ann Surg* **232**, 133–142.
- Lamb, J. R., Patel, H., Montminy, T., Wagner, V.E., & Iglewski (2003).** Functional domains of the RhIR transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **185**, 7129-7139.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. & Lazdunski, A. (1996).** A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**, 1137-1146.
- Lavenir, R., Sanroma, M., Gibert, S., Crouzet, O., Laurent, F. & Kravtsoff, A (2008).** Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: invasion and selection of clonal complexes. *J Appl Microbiol* **105**, 1491–1501.
- Lee, D. G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M., Deziel, E., Friedman, L., Li, L., Grills, G., Montgomery, K., Kucherlapati, R., Rahme, L.G., & Ausubel, F. M. (2006).** Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is Combinatorial R90.2 *Genome Biology*, **7**, R90.1-R90.14.

- Li, L. L., Malone, J. E. & Iglewski, B. H. (2007).** Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. *J Bacteriol.* **189**, 4367-4374.
- Martin, P.R., Watson, A.A., McCaul, T.F. & Mattick, J. S. (1995).** Characterization of a five-cluster required for the biogenesis of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **16**, 497-508.
- Medina, G., Juárez, K., Valderrama, B. & Soberón-Chávez, G. (2003a).** Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhIR transcriptional regulation of the *rhIAB* promoter. *J Bacteriol.* **185**, 5976-5983.
- Medina, G., Juárez, K., Díaz, R. & Soberón-Chávez, G. (2003b).** Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa rhIR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* **149**, 3073-3081.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. 352–355. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Migula, W. (1894).** Über ein neues System der Bakterien. *Arb Bakteriol Inst Karlsruhe* **1**, 235–328.
- Morihara, K. (1995).** Pseudolysin and other pathogen endopeptidases of thermolysin family. *Methods Enzymol.* **248**, 242-253.
- More, M. I., Finger, L. D., Stryker, J. L., Fuqua, C., Eberhard, A. & Winans, S. C. (1996).** Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* **272**, 1655–1658.
- Muller, M. (2002).** Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 1527–1533.
- Nam, T. W., Park, Y. H., Jeong, H. J., Ryu, S. & Seok, Y. J. (2005).** Glucose repression of the *Escherichia coli sdhCDAB* operon, revisited: regulation by the CRP*cAMP complex. *Nucleic Acids Res.* **27**, 6712-6722.
- Ng, W.L. & Bassler, B. L. (2009).** Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet.* **43**, 197-222.
- Ochsner, U. A., Koch, A. K., Fiechter, A. & Reiser, J. (1994).** Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **176**, 2044-2054.
- Ochsner, U.A. & Reiser, J. (1995).** Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**, 6424-6428.
- Palleroni, N. J. (2010).** The *Pseudomonas* Story *Environmental Microbiology* **12**, 1377–1383.
- Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L. & Iglewski. (1983).** Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science.* **260**, 1127-1130.

- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C., Iglewski, B. H. (1997).** Regulation of *las* and *rhl* Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* **179**, 3127–3132.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B. J., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P. & Iglewski, B.H (1999).** Quinolone signaling in the cell to cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11229-11234.
- Pellett, S., Bigley, D.V., and Grimes, D.J. (1983).** Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in a riverine ecosystem. *Appl Environ Microbiol* **45**, 328–332.
- Pier, G.B., Coleman, F., Grout, M., Franklin, M. & Ohman, D. E. (2001).** Role of alginate O acetylation in Resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis *Infect Immun* **69**, 1895–1901.
- Pier, G.B. (2007).** *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity *Int J Med Microbiol.* **297**, 277–295.
- Pirnay, J.-P., Matthijs, S., Colak, H., Chablain, P., Bilocq, F., Van Eldere, J. (2005).** Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ Microbiol* **7**, 969–980.
- Preston, M. J., Seed, P. C., Toder, D. S., Iglewski, B. H., Ohman, D. E., Gustin, J. K., Goldberg, J. B. & Pier, G. B. (1997).** Contribution of proteases and LasR to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infections. *Infect Immun.* **65**, 3086-3089.
- Price-Whelan, A., Dietrich, L. E. & Newman, D.K. (2007).** Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol.* **189**, 6372-6381.
- Rada, B. & Leto, T.L. (2009).** Redox warfare between airway epithelial cells and *Pseudomonas*: dual oxidase versus pyocyanin. *Immunol Res.* **43**,198-209.
- Rahme, L. G., Ausubel, F. M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B.C., Lau, G. W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M. W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C. L. & Tompkins, R. G. (2000).** Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 8815-8821.
- Rampioni, G., Schuster, M., Greenberg, E. P., Bertani, I., Grasso, M., Venturi, V., Zennaro, E. & Leoni, L. (2007).** RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **66**, 1557-1565.
- Ramsey, M. D. & Wozniak, D. J. (2005).** Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Molecular Microbiology* **56**, 309–322.
- Rocchetta, H. L., Burrows, L.L & Lam, J.S. (1999).** Genetics of O-Antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Biol. Reviews.* **63**, 523-553.
- Ruby, E. G. (1996).** Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 591–62.

- Ryder, C., Byrd, M. & Wozniak, D. J. (2007).** Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. Development. *Curr Opin in Microbiol.* **10**, 644–648.
- Schaefer, A. L., Val, D.L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E Jr. & Greenberg, E. P. (1996).** Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9505–9509.
- Schmidtchen, A., Holstb, E., Tapper, H. & Bjorck, L. (2003).** Elastase-producing *Pseudomonas aeruginosa* degrade plasma proteins and extracellular products of human skin and fibroblasts, and inhibit fibroblast growth. *Microb Pathog.* **34**, 47-55.
- Schuster, M. & Greenberg, P. E. (2006).** A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol*, **296**, 73-81.
- Schuster, M., Urbanowski, M. L. & Greenberg, E. P. (2004).** Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc. Natl Acad Sci US A* **101**, 15833-15839.
- Semmler, A.B., Whitchurch, C.B., Leech, A.J. & Mattick, J.S. (2000).** Identification of a novel gene, *fimV* involved in twitching motility in *P.aeruginosa*. *Microbiology.* **146**, 1321-1332.
- Simons, R.W., Houman, F & Kleckner, N. (1987).** Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**, 85-96.
- Simpson, J. A., Smith, S. E. & Dean, R T. (1989).** Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages. *Free Radical Biol. Med.* **6**, 347-353.
- Sio, C. F., Otten, L. G., Cool, R. H., Diggle, S. P., Braun, P. G., Bos, R., Daykin, M., Camara, M., Williams, P. & Quax, W. J. (2006).** Quorum quenching by an N-Acyl-Homoserine Lactone Acylase from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Immun* **74**, 1673-1682.
- Soberón-Chávez, G., Aguirre-Ramírez, M. & Ordóñez, L. G. (2005).** Is *Pseudomonas aeruginosa* only sensing quorum? *Critical Rev Microbiol* **31**, 171-182.
- Somerville, M., Taylor, G. W., Watson, D., Rendell, N. B., Rutman, A., Todd, H., Davies, J. R., Wilson, R., Cole, P. & Richardson, P.S. (1992).** Release of mucus glycoconjugates by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid into feline trachea in vivo and human bronchus *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **6**, 116-122.
- Sotirova, A. V., Spasova, D. I., Galabova, DN., Karpenko, E. & Shulga A. (2008).** Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. *Curr Microbiol.* **56**, 639-644.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N. J. & Doudoroff, M. (1966).** The Aerobic Pseudomonads: a Taxonomic Study *J. gen. Microbiol.* **43**, 159-271.
- Stevens, A. M., Dolan, K. M. & Greenberg, E. P. (1994).** Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the lux promoter region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12619–12623.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F.S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., 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., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S. & Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. **406**, 959-964.

Sudakevitz, D., Levene, C., Sela, R. & Gilboa-Garber, N. (1996). Differentiation between human red cells of Pk and p blood types using *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin, *Transfusion* **36**, 113–116.

Suh, S. J., Runyen-Janecky, L. J., Maleniak, T. C., Hager, P., MacGregor, C. H., Zielinski-Mozny, N. A., Phibbs, P. V Jr. & West, S. E. (2002). Effect of *vfr* mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* **148**, 1561-1569.

Toribio, J., Escalante, A. & Soberon-Chavez G (2010). Production of rhamnolipids in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112**, 1082–1087.

Traidej, M., Marquart, M. E., Caballero, A. R., Thibodeaux, B.A. & 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.

Van Delden, C & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerg Infect Diseases* . **4**, 551-560

Van Gennip, M., Christensen, L. D., Alhede, M., Phipps, R., Jensen, P. O., Christophersen, L., Pamp, S. J., Moser, C., Mikkelsen, P.J., Koh, A.Y., Tolker-Nielsen, T., Pier, G. B., Hoiby, N., Givskov, M. & Bjarnsholt, T.(2009). Inactivation of the *rhIA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* prevents rhamnolipid production, disabling the protection against polymorphonuclear leukocytes. *Apmis* **117**, 537–546.

West, S. E., Sample, A. K. & Runyen-Janecky, L. J. (1994). The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J Bacteriol.* **176**, 7532-7542.

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

Whitchurch, C.B., Leech, A.J., Young, M.D., Kennedy, D., Sargent, J.L., Bertrand, J.J., Semmler, A.B., Mellick, A.S., Martin, P.R., Alm, R.A., Hobbs, M., Beatson, S.A., Huang, B., Nguyen, L., Commolli, J.C., Engel, J.N., Darzins, A. & Mattick J.S. (2004). Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* **52**, 873-93.

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

Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., Kohler, T., Van Delden, C., Weinel, C., Slickers, P. & Tummeler, B. (2007). Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 8101–8106.

Williams, P., Winzer, K., Chan, W. C. & Cámara, M. (2007). Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Phil. Trans. R. Soc. B* **362**, 1119-1134.

Williams, P. & Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin in Microbiol.* **12**, 182–191.

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

Xiao, G., He, J. & Rahme, L. G. (2006). Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology.* **152**, 1679-1686.

Yang, J., Chen, L. H., Sun, L. L., Yu, J. & Jin, Q. (2008). VFDB 2008 release: an enhanced web-based resource for comparative pathogenomics. *Nucleic Acids Res.* **36**, D539-D542.

Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S. R., Sockett, R. E., Goldner, M., Dessaux, Y., Cámara, M., Smith, H. & Williams P. (2002). N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* **70**, 5635-5646.

Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* *rhIR*: role of the CRP orthologue Vfr (virulence factor regulator) and quorum-sensing regulators LasR and RhIR

Gerardo Croda-García, Victoria Grosso-Becerra, Abigail Gonzalez-Valdez, Luis Servín-González and Gloria Soberón-Chávez

Correspondence

Gloria Soberón-Chávez
gloria@biomedicas.unam.mx

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo Postal 70228, México DF 04510, Mexico

1

The production of many virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* is regulated by the quorum-sensing (QS) response. In this regulatory network LasR and RhIR, bound to their corresponding autoinducers, play a central role. The QS response has a hierarchical structure: LasR/3O-C12-HSL activates the transcription of *rhIR*, and RhIR/C4-HSL activates the transcription of several genes, including *rhIAB* operon, which encodes the enzymes responsible for rhamnolipid synthesis. The *rhIAB* operon is located immediately upstream of the *rhIR* gene. *rhIR* has four transcription start sites, two of which are located in the *rhIB* coding region. Vfr directly activates transcription of *lasR*, and has been reported to be also involved in *rhIR* expression. The aim of this work was to characterize the details of the mechanism of *rhIR* transcriptional regulation. We show that Vfr directly regulates *rhIR* transcription through its binding to several Vfr-binding sites (VBSs) present in the *rhIR* promoter region, one of which has a negative effect on transcription. Two of the VBSs overlap with *las* boxes where LasR/3O-C12-HSL binds to activate *rhIR* transcription. We also show that *rhIR* transcription is subject to positive-feedback autoregulation through RhIR/C4-HSL activation of the *rhIA* promoter. This positive autoregulation plays a major role in *rhIR* expression.

Received 31 March 2011

Revised 6 June 2011

Accepted 27 June 2011

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous Gram-negative bacterium that can survive and proliferate in diverse environments due to its great metabolic versatility. This bacterium is an opportunistic pathogen that can cause infections in a diverse range of organisms, including mammals, plants, insects and nematodes. The infection produced by *P. aeruginosa* generally involves the production of a wide array of cell-associated and extracellular virulence factors. The extracellular virulence factors produced by *P. aeruginosa* include pyocyanin, elastase, rhamnolipids, alkaline protease, lectins, exotoxin A and HCN. The production of these virulence factors is under the control of quorum sensing (QS) (Williams & Cámara, 2009). QS is a process that allows bacteria to regulate gene expression in response to self-produced intercellular signalling molecules known as autoinducers and to have

a population density-dependent response (Williams & Cámara, 2009).

In *P. aeruginosa* there are two QS systems dependent on acylhomoserine lactone (AHL) autoinducers, the *las* and *rhl* systems. In the *las* system, the transcriptional regulator LasR coupled with 3-oxododecanoyl homoserine lactone (3O-C12-HSL), whose synthesis is catalysed by the LasI protein, activates the expression of genes for several virulence factors such as elastase, exotoxin A and alkaline protease, and also the gene encoding the transcriptional regulator RhIR (Latifi *et al.*, 1996). In the *rhl* system, the complex formed by RhIR and butyryl homoserine lactone (C4-HSL, the autoinducer whose synthesis is catalysed by RhII), promotes the expression of genes responsible for the production of pyocyanin, PA-I lectin (encoded by *lecA*), and the *rhIAB* operon coding for enzymes involved in the production of the biosurfactant rhamnolipids (Williams & Cámara, 2009).

The *rhIR* gene has four promoters, two of which are located in the upstream *rhIB* coding region (Medina *et al.*, 2003a). LasR, which belongs to the LuxR family of transcriptional regulators, whose members bind to *lux* boxes, was

Abbreviations: C4-HSL, butyryl homoserine lactone; 3O-C12-HSL, 3-oxododecanoyl homoserine lactone; CRP, cAMP receptor protein; QS, quorum sensing; VBS, Vfr-binding site.

A supplementary table of primers is available with the online version of this paper.

identified as the protein responsible for *rhlR* transcriptional activation (Latifi *et al.*, 1996; Medina *et al.*, 2003a). LasR/3O-C12-HSL transcriptional regulation of *rhlR* was shown to be due to its activation of promoter 1 through its binding to a *las* box (the *rhlR*-1 *las* box), and possibly also of promoter 4 (Medina *et al.*, 2003a). A second LasR/3O-C12-HSL-binding site was identified upstream of *rhlR* promoter 1 by the analysis of DNA sequences after immunoprecipitation of DNA–LasR complexes (Gilbert *et al.*, 2009). Transcription initiation at promoter 2 was shown to be constitutive. The *rpoN* gene product appears to be involved in the activation of promoter 3, although its effect seems to be indirect due to the absence of a consensus sequence for the binding of this sigma factor. *rhlR* activation is regulated by Vfr, a member of the cAMP receptor protein (CRP) family, but it has not been demonstrated whether this regulation is direct. There are data suggesting the direct interaction of this protein, since transcription initiation at *rhlR* promoter 4 is affected by Vfr, and a putative Vfr-binding sequence (VBS) has been identified in this region (Medina *et al.*, 2003a).

Vfr acts at the top of the regulatory QS cascade, since this is the only protein known to be directly involved in the transcriptional activation of *lasR* (Albus *et al.*, 1997); the transcriptional activation of *lasR* by Vfr is independent of cAMP binding by this protein (Fuchs *et al.*, 2010). It has been reported that RpoN is involved in Vfr transcription (Heurlier *et al.*, 2003), so the effect of this sigma factor in *rhlR* transcription might be indirect.

The aim of this work was the detailed characterization of the mechanism of *rhlR* transcriptional regulation, specifically in relation to the role of Vfr in this process. We show that Vfr directly regulates *rhlR* transcription by binding to several *vfr* boxes present in the *rhlR* promoter region, one of which has a negative effect on transcription. We also show that *rhlR* transcription is subject to a positive feedback autoregulatory loop through RhlR/C4-HSL activation of the *rhlA* promoter. This positive autoregulation plays a major role in RhlR expression, and thus in *P. aeruginosa* QS.

METHODS

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. Bacterial strains and plasmids used in this study are shown in Table 1. Bacterial strains were cultured at 37 °C; either on PPGAS medium pH 7.2 (Zhang & Miller, 1992), or on Luria–Bertani (LB) medium (Miller, 1972), as stated. Growth was monitored by measuring OD₆₀₀. When necessary, antibiotics were added at the following concentrations (µg ml⁻¹): ampicillin 200, kanamycin 75, and chloramphenicol 30 for *Escherichia coli*; or carbenicillin 200, tetracycline 150, and streptomycin 600 for *P. aeruginosa*.

Cells of *P. aeruginosa* strains PAO1, PAO1V, PW6882, PAO1-WV and PAO1-WA, containing a reporter *lacZ* gene fusion, or the expression vector, were grown overnight at 37 °C in LB medium (supplemented with carbenicillin) with shaking; they were then subcultured into PPGAS at a starting OD₆₀₀ of 0.05 and incubated at 37 °C with vigorous shaking (225 r.p.m.) until the culture reached the

late-exponential phase, when the system is already induced. β-Galactosidase activity was measured as described by Miller (1972). Each culture was assayed in triplicate; results were confirmed in at least three independent experiments. To test the ability of Vfr and LasR to activate the expression of *rhlR* in *E. coli*, cultures of *E. coli* strains TGC000, TGC001 and TGC002 harbouring plasmid pWNP28 or pMT1 or the empty vector were grown overnight in LB medium at 37 °C supplemented with ampicillin and subcultured into LB supplemented with 50 mM MOPS (pH 7.0) at a starting OD₆₀₀ of 0.05. After incubation at 37 °C with vigorous shaking (225 r.p.m.) until the cultures reached an OD₆₀₀ of 0.4, IPTG was added to a final concentration of 1 mM; 3O-C12-HSL was also added at this time to a final concentration of 5 µM for strains containing plasmid pMT1, which encodes LasR, and to its corresponding empty vector (Table 1). After the additions *E. coli* cultures were allowed to grow for additional 1.5 h; then cells were collected and β-galactosidase activity was determined (Miller, 1972). The culture conditions to measure β-galactosidase activity were standardized to obtain similar levels of expression promoted by Vfr of a *lacZ* fusion that contains a CRP-binding site to that promoted by CRP itself (data not shown). The statistical significance of the results presented in this work was determined using Student's one-tailed *t*-test.

To generate a *vfr* mutant in the PAO1 background and a *vfr* mutant in the background of strain PW6882, we transduced the *vfr*::ΩSp/Sm marker from strain PAO6301 into strains PAO1 and PW6882, respectively, using bacteriophage E79tv-2 as described by Morgan (1979). Strain PAO1-WA was also constructed by transduction with phage E79tv-2 of the *rhlA*::ΩGm mutation described previously (Rahim *et al.*, 2001) into strain PW6882.

To determine pyocyanin concentration we used the method reported previously (Essar *et al.*, 1990). In summary this method consists in extracting 16 h PPGAS culture supernatant with 0.3 vol. chloroform, and acidifying the organic phase by addition of 0.1 vol. 0.2 M HCl to obtain a pink solution. Pyocyanin concentration (µg ml⁻¹) was determined spectrophotometrically at a wavelength of 520 nm, using a molar absorption coefficient of 17 072 l mol⁻¹ cm⁻¹.

DNA techniques. Standard recombinant DNA manipulation techniques were used (Sambrook *et al.*, 1989). Oligonucleotide synthesis and DNA sequencing were done at the facilities of the Instituto de Biotecnología, UNAM. Plasmids were introduced into *E. coli* and *P. aeruginosa* by transformation (Chung *et al.*, 1989; Irani & Rowe, 1997). The identification of putative VBS sequences was performed using a relaxed Vfr consensus sequence and the program fuzznuc of the EMBOSS package using the 500 bp sequence upstream of the *rhlR* translational start site.

Conditions for RT-PCR used to determine the presence of a transcript extending from *rhlA* to *rhlR* and the *rpoD* transcript (used as positive control in these experiments) were as follows. Strains PAO1 and PW6887 were grown in PPGAS medium to an OD₆₀₀ of 1.5. RNA was isolated using the RNeasy Protect Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. Then RNA was treated with DNase I (Qiagen) and repurified using the hot phenol protocol (Aiba *et al.*, 1981). Synthesis of cDNA was performed using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) with 1.5 µg DNA-free total RNA and 2 pmol *rhlR*-specific primer (R-*rhlABR*; see Supplementary Table S1, available with the online version of this paper) or *rpoD*-specific primer (R-*rpoD*, Table S1).

The cDNA thus synthesized was used as template for PCR, using primers R-*rhlABR* and F-*rhlA* (Table S1). To further confirm that the PCR product contained the sequence corresponding to the mRNA extending from *rhlA* to *rhlR* we amplified by PCR an internal sequence using as primers R-*rhlABR* and an internal *rhlA* sequence (F¹-*rhlA*, Table S1). Genomic DNA of PAO1 served as a positive control for the

Table 1. Bacterial strains and plasmid used in this work

| Strain or plasmid | Relevant genotype | Source |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|
| <i>E. coli</i> | | |
| SA2777 | F ⁻ <i>his rpsL relA crp::cat</i> | Nam <i>et al.</i> (2005) |
| DH5 α | F'/ <i>endA1 hsdR17 supE44 thi-1 recA1 gyrA relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR [φ80 dlacZΔM15 recA1]</i> | Miller (1972) |
| TE2680 | F ⁻ , λ ⁻ , IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1 Δ(<i>lac</i>)X74 <i>rpsL galK2 recD1903::Tn10d-Tet rpDC700::putPA1303::[Kan^S-Cam^R-lacZ]</i> | Elliott (1992) |
| TGC000 | SA2777 <i>rhIR'</i> - <i>lacZ</i> (nt -500 to +242) wild-type | This study |
| TGC001 | SA2777 <i>rhIR'</i> - <i>lacZ</i> (nt -61: G→T; nt -60: A→T; nt -59:C→G) | This study |
| TGC002 | SA2777 <i>rhIR'</i> - <i>lacZ</i> (nt -114: G→T; nt -113: C→G; nt -112: A→T) | This study |
| MC4100 | <i>araD139 Δ(argF-lacU169) rpsL150 thiA1 relA1 fib-5301 deoC ptsF25 rbsR</i> | Casadaban (1976) |
| ABI-lasI | MC4100 derivative with a chromosomal Φ(<i>pZlasI'</i> - <i>lacZ</i>) | This study |
| ABI-rhIA | MC4100 derivative with a chromosomal Φ(<i>pZrhIA'</i> - <i>lacZ</i>) | This study |
| ABI-rhIR1 | MC4100 derivative with a chromosomal Φ(<i>pZrhIR-1'</i> - <i>lacZ</i>) | This study |
| <i>P. aeruginosa</i> | | |
| PAO1 | Wild-type strain of the MPAO1 subline | Jacobs <i>et al.</i> (2003) |
| PAO1- <i>rhIA</i> | PAO1 <i>rhIA::Ω Gm</i> | Rahim <i>et al.</i> (2001) |
| PAO1V | PAO1 <i>vfr::Ω Sp/Sm</i> | This study |
| PAO6301 | PAO1 <i>vfr::Ω Sp/Sm</i> | Fox <i>et al.</i> (2008) |
| PW6882 | PAO1 _{UW} mutant ID:3452 <i>rhIR::Tn' lacZ</i> | Jacobs <i>et al.</i> (2003) |
| PW6887 | PAO1 _{UW} mutant ID:54908 <i>rhIA::ISphoA/hah</i> | Jacobs <i>et al.</i> (2003) |
| PAO1-WV | PW6882 <i>vfr::Ω Sp/Sm</i> | This study |
| PAO1-WA | PW6882 <i>rhIA::Ω Gm</i> | This study |
| Plasmids | | |
| pLP170 | <i>lacZ</i> transcriptional fusion vector that contains an origin of replication for both <i>P. aeruginosa</i> and <i>E. coli</i> , Ap ^R Cb ^R | Preston <i>et al.</i> (1997) |
| pPCS1002 | <i>rhIR</i> promoter region (nt -500 to +242) cloned in pLP170 to create an <i>rhIR'</i> - <i>lacZ</i> transcriptional fusion | Pesci <i>et al.</i> (1997) |
| pPGC2001 | Derived from pPCS1002; <i>rhIRp</i> (nt -115: G→T; nt -114: C→G; nt -113: A→T)-' <i>lacZ</i> | This study |
| pPGC2002 | Derived from pPCS1002; <i>rhIRp</i> (nt -114: G→T; nt -113: C→G; nt -112: A→T)-' <i>lacZ</i> | This study |
| pPGC2003 | Derived from pPCS1002; <i>rhIRp</i> (nt -165: C→T; nt -164: A→T, nt -162: A→T)-' <i>lacZ</i> | This study |
| pPGC2004 | Derived from pPCS1002; <i>rhIRp</i> [nt -209: A→T; nt -08: C→G; nt-207: A→T)-' <i>lacZ</i> | This study |
| pPGC2005 | Derived from pPGC2001; <i>rhIRp</i> (nt -71: C→T) -' <i>lacZ</i> | This study |
| pPGC2006 | Derived from pPGC2002; <i>rhIRp</i> (nt -117: C→T)-' <i>lacZ</i> | This study |
| pPGC2008 | <i>rhIR</i> promoter region from nt -469 to -121 in pLP170; contains promoters 4 and 3 | This study |
| pPGC2008-1 | Derived from pPGC2008, with (nt -209: A→T; nt -208: C→G; nt -207: A→T) | This study |
| pPGC2008-2 | Derived from pPGC2008, with (nt -379: C→T; nt -378: T→G) | This study |
| pRS551 | <i>E. coli lacZ</i> reporter gene fusion vector, Ap ^R Km ^R | Simons <i>et al.</i> (1987) |
| pPGC2010 | <i>rhIR</i> promoter (nt -500 to +242) cloned in pRS551 to create an <i>rhIR'</i> - <i>lacZ</i> transcriptional fusion | This study |
| pPGC2011 | <i>rhIR</i> promoter with the following mutations: (nt -61: G→T; nt-60: A→T; nt-59:C→G)-' <i>lacZ</i>) on pRS551 | This study |
| pPGC2012 | <i>rhIR</i> p promoter with the following mutations (nt -114: G→T; nt -113: C→G; nt -112: A→T)-' <i>lacZ</i>) on pRS551 | This study |
| pMMB66EH | Broad-host-range <i>tacp</i> expression vector <i>lacI^q</i> , Ap ^R | Fürste <i>et al.</i> (1986) |
| pWNP28 | <i>tacp-vfr</i> on pMMB66EH | Suh <i>et al.</i> (2002) |
| pUCP20 | Cloning vector able to replicate in <i>P. aeruginosa</i> and <i>E. coli</i> , with <i>plac</i> ; Ap ^R Cb ^R | West <i>et al.</i> (1994b) |
| pMT1 | <i>plac-lasR</i> on pUCP20 | Medina <i>et al.</i> (2003b) |
| pGMYC | <i>plac-rhIR</i> on pUCP20 | Medina <i>et al.</i> (2003b) |

fragments amplified. A reverse transcription reaction in which reverse transcriptase was omitted served as a negative control.

Construction of plasmids. For construction of plasmid pPGC2008, an *rhIR* promoter containing a DNA fragment corresponding to nucleotides -468 to -120 relative to the *rhIR* translational start site was amplified by PCR from PAO1 chromosomal DNA using primers

designed to contain *EcoRI* and *BamHI* restriction sites (Table S1). The PCR product was digested with *EcoRI* and *BamHI* and the resulting DNA fragment was ligated into *EcoRI*- and *BamHI*-digested plasmid pLP170 (Preston *et al.*, 1997). To generate plasmids pPGC2001, pPGC2002, pPGC2003, pPGC2004, pPGC2005 and pPGC2006, containing point mutations in the different *vfr* boxes and *las* boxes, pPCS1002 was used as a template and the QuikChange XL

6

site-directed mutagenesis kit (Stratagene) was used according to the manufacturer's instructions; the sequences of the plasmids were corroborated. The oligonucleotides used in the construction of *rhIR* transcriptional fusions are provided in Table S1.

To construct plasmids pPGC2010, pPGC2011 and pPGC2012, the corresponding *rhIR'*-*lacZ* transcriptional fusions were released from plasmid pLP170 (Preston *et al.*, 1997) by digestion with *EcoRI* and *BamHI*, and inserted into plasmid pRS551 (Elliott, 1992), previously digested with the same enzymes.

Construction of *E. coli* strains. Wild-type and mutant *rhIR* promoter fragments were removed from plasmid pPCS1002 (Pesci *et al.*, 1997; Table 1) and derivatives with an *EcoRI* and *BamHI* double digest. Promoter fragments were cloned in pRS551 (Elliott, 1992) previously digested with the same enzymes. Plasmids pPGC2010–12 carrying the *rhIR'*-*lacZ* fusions were introduced into the *E. coli* TE2680 chromosome by the method described previously (Elliott, 1992; Simons *et al.*, 1987). P1_{vir} transduction was used to move promoter fusions from the chromosome of TE2680 to the chromosome of SA2777 (Miller, 1972; Nam *et al.*, 2005).

Determination of LasR and RhIR binding to *las* boxes. To measure *in vivo* RhIR and LasR binding to different DNA sequences (*las* boxes) we constructed hybrid promoters with consensus -10 and -35 RNA polymerase recognition sequences separated by 19 bp with the sequence corresponding to the *rhIA las* box, the *rhIR-1 las* box or the *lasI las* box. Autoinducers were added at 5 μM (3O-C12-HSL) or 10 μM (C4-HSL) in the presence of LasR (encoded in plasmid pMT1) or RhIR (encoded in plasmid pGMYC), respectively.

Complementary oligonucleotides with the sequence of the artificial promoters with *rhIA*, *rhIR-1* or *lasI las* boxes between the -10 and -35 RNA polymerase recognition sites, flanked by *EcoRI* and *BamHI* restriction sites, were hybridized to form a double-stranded DNA fragment and cloned into plasmid pRS551 (Elliott, 1992; Simons *et al.*, 1987) digested with the two endonucleases, to produce transcriptional *lacZ* fusions. These plasmid-encoded *lacZ* fusions were introduced into the *E. coli* MC4100 chromosome by the method described above (Elliott, 1992; Simons *et al.*, 1987). Plasmids coding for RhIR (pGMYC, Table 1; Medina *et al.*, 2003b) or LasR (pMT1, Table 1; Medina *et al.*, 2003b) were introduced into the *E. coli* strains (ABI-*rhIA*, ABI-*rhIR-1*, and ABI-*lasI*, Table 1) harbouring the chromosomally encoded *lacZ* fusions with the artificial promoters. The extent of *lacZ* repression in the presence of RhIR, RhIR/C₄-HSL or LasR/3O-C12-HSL corresponds to the binding of these proteins with or without their corresponding autoinducers.

RESULTS AND DISCUSSION

Vfr directly activates *rhIR* transcription

The *rhIR* gene was proposed to be under Vfr control because the *rhIR'*-*lacZ* fusion encoded in plasmid pPCS1002, which contains the four reported promoters (Fig. 1), showed reduced expression when transferred to a *vfr* mutant derivative of the PAO1 strain (Medina *et al.*, 2003a). However, it was not determined whether this effect was a direct consequence of Vfr binding to the *rhIR* promoter region or an indirect effect, since Vfr activates *lasR* transcription (Fuchs *et al.*, 2010) and in turn LasR/3O-C12-HSL directly activates *rhIR* transcription (Latifi *et al.*, 1996; Medina *et al.*, 2003a).

To determine whether Vfr directly activates *rhIR* transcription, we measured Vfr-dependent activation of an *rhIR'*-*lacZ* fusion inserted into the chromosome of an *E. coli crp* mutant strain (TGC000, Table 1, Fig. 2). We used an *E. coli crp* mutant since *vfr* has been shown to complement a *crp* mutation (West *et al.*, 1994a). Vfr is indeed able to directly activate *rhIR* transcription in the *E. coli* genetic background, since a significant increase in β-galactosidase activity from 73 ± 11 to 225 ± 32 Miller units was obtained when Vfr was induced; the uninduced level was similar to that obtained with the vector alone: 83 ± 43 Miller units in the presence of IPTG (Fig. 2a). The use of *E. coli* as heterologous host for Vfr-dependent expression of *rhIR* shows that this protein directly activates *rhIR* transcription, but cannot be used to infer the strength of *rhIR* Vfr-dependent promoter in *P. aeruginosa* background since there are several factors that can modify the level of expression of Vfr-dependent promoters in *E. coli*, such as the expression of Vfr itself, the concentration of cAMP that is suitable for Vfr activity (in the case that the binding of this cyclic nucleotide is required for the activation by Vfr), and the interaction of Vfr with its RNA polymerase, for example. It is also important to bear in mind that *lacZ* expression is driven by a single copy of this reporter gene encoded in the chromosome and that it cannot be compared to the expression of this gene when gene fusions

```

-499 GCAGCGCCCTACGCGCCACTGGGAGCCTTGCTGCCATCGTGCGCCGGGCTGGTCCATCCGGGCGGTATCGGCGCCATGA
                                     las box 2
-419 GCCTAGCCTTGGCGCGGGGGTCCCGCAGGTGCTGCTGCCCTGTGCCACGACCAAGTTCGACAATGCCGAACGGCTGGTC
-339 CGGCTCGGCTGCGGGATGCGCCTGGGCGTCCGTTGCGCGAGCAGGAGTTGCGCGGGGCGCTGTGGCGCTTGTCTGAGG
                                     T4 ▾→ VBS 4
-259 ACCCGCCATGGCGCGCCCTGTCCGGCTTTCATGGAATTGTCAACAACCGCACAGTATCGCTTGGGTAAGCGGCCCAGG
                                     VBS 3 T3 ▾→ VBS 2 las box 3
-179 TGGTCGAACCTGTTGCATAGGGAGGGGGATGCTCGATGGCTGAAGGCTGCGTCTCTGAACCGTGTGGCATACAGATAGGG
                                     VBS 1 T2 ▾→ T1 ▾→
-99 TTGCCATGATTTGCCGTATCGGCAGAGGCTGCGCGCTTGACAGCGTCATACCCGGGCAATTCTGCTGTGATGCAATTTATC
                                     las box 1
-16 GATCAGGGCTACTGCAATG AGG ATG ACG GAG GCT TTT TGC TGT GGT GGG ACG GTT TGC GTA GCG AGA TGC
    
```

Fig. 1. Nucleotide sequence of the *rhIR* promoter region, showing relevant DNA motifs. The *rhIR* start and *rhIB* stop codons are indicated in grey. The *rhIR* mRNA start sites are indicated in bold italic and with a bent arrow. The *las* box nucleotide sequences are underlined. Putative Vfr-binding sites (VBSs) are boxed.

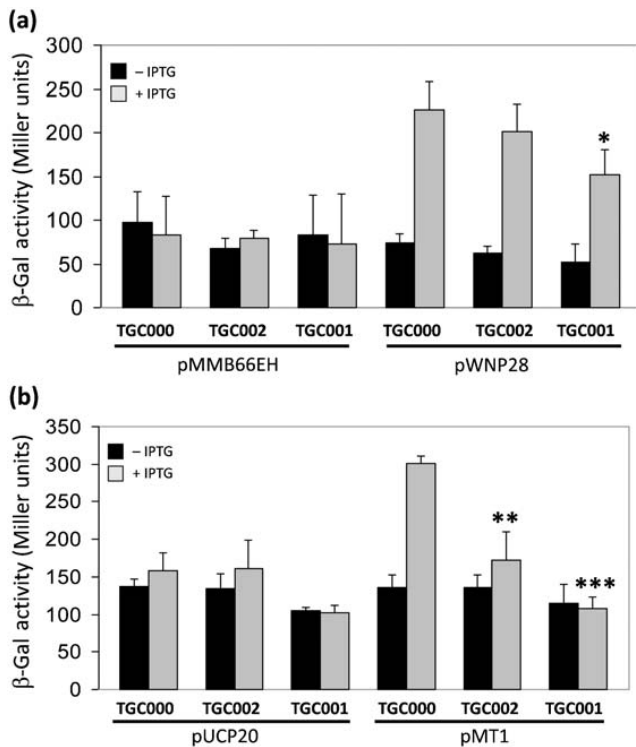


Fig. 2. Expression of different *rhIR'*-*lacZ* fusions inserted in the chromosome of an *E. coli* *crp* mutant promoted by Vfr (encoded in plasmid pWNP28) or LasR (encoded in plasmid pMT1) supplemented with 5 μ M 3O-C12-HSL. TGC000 corresponds to the wild-type *rhIR* promoter region, TGC001 to the same region carrying mutations that inactivate VBS1 motif, and TGC002 to the region with mutations that inactivates VBS2 sequence. The statistical significance of the results was determined by Student's one-tailed *t*-test. The results obtained have a level of significance of $P < 0.001$ when compared with TGC000 induced by Vfr (*); and of $P < 0.05$ (**) and $P < 0.001$ (***) when compared with the results obtained with TGC000 induced by LasR.

encoded in plasmids are used. In general, the study of a *P. aeruginosa* regulatory mechanism in the *E. coli* background enables a complex phenomenon to be dissected and analysed, but this approach has the drawback of missing some parts of the regulatory network that are not present, or are different in *E. coli*.

Activation of the *rhIR'*-*lacZ* fusion was also observed when a plasmid encoding CRP, instead of Vfr, was used. These findings confirm that there is a direct interaction of Vfr with the *rhIR* promoter region, and suggest that it presumably occurs through its binding to a VBS, which has a similar sequence to *crp* boxes (Kanack *et al.*, 2006).

Identification of VBSs in the *rhIR* upstream region

Since the effect of Vfr on the expression of *rhIR* is positive, we performed the identification of VBS in the upstream region of this gene using the reported consensus sequence

for Vfr binding (Kanack *et al.*, 2006). This search revealed the presence of four imperfect putative Vfr-binding sequences (VBS1–VBS4) (Fig. 1, Table 2) that were not detected in a previous analysis (Kanack *et al.*, 2006), possibly because VBS2, VBS3 and VBS4 are encoded within the *rhIB* open reading frame and only intergenic regions were analysed, and due to differences of VBS1 sequence from the consensus sequence used to do the search (Table 2).

To test the functionality of these sequences we constructed mutations that eliminate each of the putative VBSs detected that are present in plasmid pPCS1002 (mutations are encoded in plasmids pPGC2001, pPGC2002, pPGC2003 and pPGC2004, described in Table 1) and tested their expression in *P. aeruginosa* PAO1 (Table 2). These experiments show that three of the putative VBSs (VBS1, VBS2 and VBS3) are functional for Vfr binding (data corresponding to VBS4 are discussed below), having a positive effect on *rhIR* expression, and that the greatest positive effect is shown by VBS1 (Table 2). To determine whether the results seen in *P. aeruginosa* as to VBS1 being the most important VBS for activation of *rhIR* were also seen in the *E. coli* model, we introduced the *rhIR* promoter sequences, carrying the same point mutations that were present in plasmids pPGC2001 and pPGC2002, into the *E. coli* chromosome, in the presence of plasmid pWNP28, which codes for Vfr. The results showed that VBS1 mutation has a significant effect on *rhIR* promoter expression in the *E. coli* background, while the effect of VBS2 inactivation was not significant (Fig. 2a). These results reinforce those obtained in the PAO1 background, showing that Vfr directly activates *rhIR* transcription and that the greatest effect of gene activation by this protein is seen by its interaction with VBS1 (Fig. 2a).

Since we found that VBS4 was not involved in activation of *rhIR* gene expression and this VBS is present downstream of promoter 4 (Fig. 1; Medina *et al.*, 2003a), we explored the possibility that this site was indeed bound Vfr, but that its effect was negative on *rhIR* expression dependent on promoter 4. To study the effect of VBS4 on *rhIR* regulation we constructed a plasmid containing promoter 4 (pPGC2008 Fig. 3a, Table 1) and a derivative of this plasmid with three point mutations in VBS4 changing nucleotides described as necessary for Vfr DNA-recognition and binding (pPGC2008-1, Fig. 1, Table 1). Fig. 3(b) shows that *rhIR* expression from plasmid pPGC2008 is enhanced in the *vfr* mutant and that inactivation of VBS4 in plasmid pPGC2008-1 resulted in increased expression of *rhIR* in the wild-type strain. These results show that Vfr binding to VBS4 resulted in the repression of *rhIR* promoter 4, as was expected by the position of this sequence with respect to the transcription start site corresponding to promoter 4 (Figs 1 and 3a). However, the level of expression of promoter 4 is so low that the reduction of *rhIR* expression due to its repression by Vfr binding to VBS4 cannot be detected in the context of the entire *rhIR* upstream regulatory region encoded in plasmid pPCS1002 (Fig. 3, Table 2).

11

7

Table 2. Role of *vfr* and *las* boxes in *rhIR* expression in a *P. aeruginosa* PAO1 background

Sequences corresponding to the putative conserved half-sites are indicated in bold, and the invariant nucleotides of *las* boxes are shown in italics and underlined.

| Plasmid | Vfr box | Vfr putative DNA-binding sequence | β -Galactosidase activity (Miller units)* |
|----------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| - | Vfr consensus sequence | WW TGNGA WNY : AGWT CACAT | |
| pPCS1002 | VBS1 | A AGGCTG CGC : GCT TGACAG | 25 427 \pm 3955 |
| | VBS2 | TC CTGAA CGG : TG CTGGCA T | |
| | VBS3 | TG GTCGA ACG : TTG TCATA G | |
| | VBS4 | AT TGTCA CA- : ACC GCACA G | |
| pPGC2001 | VBS1 ⁻ | -----:----TTG-- | 5600 \pm 2080* |
| pPGC2002 | VBS2 ⁻ | -----:----TGT- | 16 745 \pm 2963* |
| pPGC2003 | VBS3 ⁻ | -----:----TT-T- | 14 300 \pm 2178* |
| pPGC2004 | VBS4 ⁻ | -----:----TGT- | 25 181 \pm 2588 |
| pPGC2005 | VBS1 ⁻ / <i>rhIR</i> -1 ⁻ | ----T-----:----TTG-- | 2836 \pm 783** |
| pPGC2006 | VBS2 ⁻ / <i>rhIR</i> -3 ⁻ | -----:--T--TGT- | 5969 \pm 1506*** |

*The statistical significance of the results was determined by Student's one-tailed *t*-test. The results obtained have a level of significance of $P < 0.001$ when compared with the results obtained with pPCS1002 (*); or when compared with pPGC2001 (**); or with pPGC2002 (***), respectively.

LasR-binding sequences overlap VBS1 and VBS2

Transcription of *rhIR* has been shown to depend on its activation by LasR/3O-C12-HSL (Latifi *et al.*, 1996; Medina *et al.*, 2003a). Two *las* boxes were originally described in the *rhIR* promoter region by analysing the expression of *rhIR-lacZ* fusions in *E. coli* (Medina *et al.*, 2003a). One of these *las* boxes, located at -42 nt from the promoter 1 transcription start site (*rhIR*-1 *las* box, Fig. 1) was proposed to be responsible for activation of *rhIR* transcription by LasR, while the putative *las* box located between -364 and -379 nt from the translation start site (*rhIR*-2 *las* box, Fig. 1) was proposed to have a negative effect on *rhIR* transcription. We constructed point mutations that eliminate the *rhIR*-2 *las* box in pPGC2008 and did not find any significant change in *rhIR* expression from this mutated plasmid (pPGC2008-2, Table 1) (data not shown).

When LasR/3O-C12-HSL binding to DNA was studied *in vivo* by immunoprecipitation of chromatin, a third *las* box was described (Gilbert *et al.*, 2009). This *las* box (*rhIR*-3 *las* box, Fig. 1) was proposed to be the site for *rhIR* activation, but this has not been experimentally validated.

To determine the functionality of the *rhIR*-1 *las* box for LasR/3O-C12-HSL binding *in vivo* we constructed an artificial *lacZ* fusion inserted into the *E. coli* MC4100 chromosome. This fusion was constructed by inserting the 19 nt sequence of this putative LasR-binding site (*rhIR*-1 *las* box, Table 3) between the -10 and -35 RNA polymerase consensus binding sequences. Thus, using this construct we can measure the binding of a protein to the DNA sequence present between the RNA polymerase -10 and -35 binding sequences, by the reduction of *lacZ* expression. In this experiment (Table 3) we used as positive control the DNA sequence of the *lasI las* box that is specifically bound by LasR/3O-C12-HSL (Schuster *et al.*,

2004), and as negative control for LasR/3O-C12-HSL binding and control of binding specificity we used the *las* box of *rhIA* that is only bound by RhIR in both the presence and absence of C4-HSL (in the first case it activates transcription, while in the second one it acts as a repressor: Medina *et al.*, 2003b). It has been recently reported that some structural characteristics of LasR that affect its capacity to reversibly bind 3-O-C12-HSL, and ultimately to bind *las* boxes, are not maintained in the purified protein (Sappington *et al.*, 2011). Thus it is preferable to use *in vivo* systems to determine LasR DNA-binding specificity rather than *in vitro* systems such as electrophoretic mobility shift assays.

It has been reported that SdiA, an *E. coli*-encoded protein of the LuxR family, can interfere with RhIR-based biosensors designed to measure C4-HSL (Lindsay & Ahmer, 2005); however, we detected no interference of SdiA in the assays used to measure RhIR binding to *las* boxes as judged by the lack of *lacZ* repression in the absence of RhIR upon the addition of C4-HSL to strain MC4100 containing the chromosomally encoded *lacZ* fusions with different *las* boxes (data not shown).

The results in Table 3 clearly show that only LasR/3O-C12-HSL and not RhIR/C4-HSL was able to specifically bind to the *rhIR*-1 *las* box DNA sequence. It is not clear why the LasR/3O-C12-HSL complex was not found bound to *rhIR*-1 *las* box when chromatin immunoprecipitation was studied (Gilbert *et al.*, 2009), but it may be that this complex is more unstable than the one formed between LasR/3O-C12-HSL and the *rhIR*-3 *las* box DNA sequence.

When the sequence of *rhIR* promoter region was analysed, it was apparent that VBS1 overlaps the *rhIR*-1 *las* box, and that VBS2 also has some bases in common with the *rhIR*-3 *las* box (Fig. 1). To determine whether the same DNA

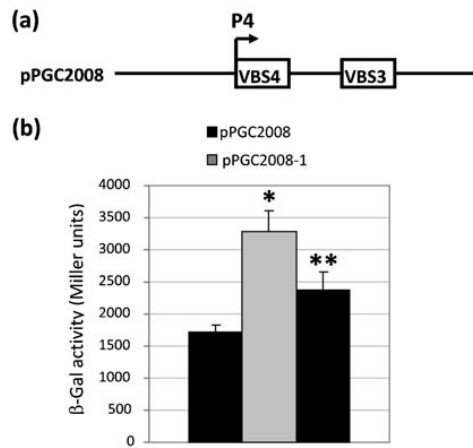


Fig. 3. Vfr represses the expression of *rhIR* promoter 4 by binding to VBS 4. (a) Diagram, not to scale, of the *rhIR* promoter 4 putative Vfr-binding site VBS4. (b) Expression of a *lacZ* fusion to *rhIR* promoters 3 and 4 (plasmid pPGC2008) in wild-type strain PAO1 and its *vfr* isogenic mutant, and the expression of plasmid pPGC2008-1, which contains the same DNA region, but carrying mutations that inactivate the VBS4 sequence, in wild-type strain PAO1. The statistical significance of the results was determined by Student's one-tailed *t*-test. The results obtained have a level of significance of $P < 0.001$ when compared with plasmid pPGC2008 expressed on PAO1 (*) and of $P < 0.001$ when compared with the expression in the PAO1 background (**).

sequences were involved in the binding of both Vfr and LasR transcriptional regulators, the point mutations that eliminate *vfr* boxes were used to determine the LasR/3O-C12-HSL activation of *rhIR-lacZ* fusions inserted into the *E. coli* chromosome (strains TGC001 and TGC002, eliminating VBS1 and VBS2, respectively, Fig. 2b). It is important to point out that these mutations were not located in positions reported to be essential for the binding of LasR (Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

Fig. 2 shows that in the *E. coli* background the same DNA sequences as found to be involved in Vfr binding (VBS1 and VBS2, Table 2) were involved in LasR/3O-C12-HSL activation of *rhIR* expression. These results also show that

Table 3. Percentage repression of the chromosome-encoded artificial *lacZ* fusions containing *las* box sequences between the -10 and -35 promoter sequences, through binding of a *P. aeruginosa* quorum sensing regulatory protein

| <i>las</i> box | LasR | | RhIR | |
|----------------|---------------------------|----------------|--------------------|----------------|
| | 3O-C12-HSL (5 μ M) | No addition | C4 (10 μ M) | No addition |
| <i>rhIR</i> -1 | 40 | 0 | 0 | 0 |
| <i>lasI</i> | 70 | 0 | 0 | 0 |
| <i>rhIA</i> | 0 | 0 | 50 | 50 |

both *las* box *rhIR*-1 and *las* box *rhIR*-3 are functional for LasR-dependent *rhIR* activation (Fig. 2b, Table 2).

We have interpreted the results in Table 2 on the basis of the interaction of Vfr with VBS1 and VBS2, but we cannot rule out that the observed effect was due, at least in part, to the inactivation of *rhIR*-1 and *rhIR*-3 *las* boxes since, as has been shown, the binding sites for these two regulatory proteins overlap. To determine whether complete inactivation of *las* box sequences by mutation of the indispensable C nucleotide at position 3 had any effect on *rhIR* expression, we constructed this mutation in the plasmids carrying inactive VBS1 and VBS2 (plasmids pPGC2005 and pPGC2006, Table 2). The results in Table 2 indicate that the effect of inactivation of both Vfr- and LasR-binding sequences is additive, suggesting that interaction with both transcriptional regulators is important for the activation of *rhIR*.

In summary, our results show that there are four functional binding sites for Vfr in the *rhIR* promoter region (Fig. 2, Table 2). Two of them (VBS1 and VBS2), located in the *rhIB-rhIR* intergenic region, have a positive effect on *rhIR* expression, and partially overlap the LasR/3O-C12-HSL-binding sites (*rhIR*-1 and *rhIR*-3 *las* boxes) (Fig. 1). Our results show that these sequences are involved in Vfr- and LasR-dependent regulation, and that there is a synergistic effect of the two types of regulation (Table 2).

RhIR positively autoregulates its expression from the *rhIA* promoter

Analysis of the *rhIR* upstream sequence (Fig. 1) shows that several of the regulatory elements involved in the regulation of this gene are encoded inside the *rhIB* coding region, and that there is no apparent transcriptional terminator upstream of *rhIR*. In addition, *rhIB* is transcribed from the *rhIA* promoter, which is specifically activated by RhIR/C4-HSL (Medina *et al.*, 2003b). This arrangement led us to propose the hypothesis that *rhIR* could be transcribed either from the four promoters described above that we and others have studied using plasmids (Latifi *et al.*, 1996; Medina *et al.*, 2003a) or from the upstream *rhIA* promoter, producing a positive loop of autoregulation. To test this hypothesis we used an *rhIR* mutant that has an in-frame *lacZ* fusion (PW6882) caused by insertion of a transposon, and expressed *rhIR* *in trans* from plasmid pGMYC (Fig. 4a). We found that β -galactosidase levels almost doubled in the presence of pGMYC, showing that RhIR positively autoregulates its expression. Overexpression of LasR or Vfr also had a positive effect on *rhIR* expression in the PW6882 background, but this effect was not as high as that seen with RhIR (Fig. 4), suggesting that the positive-feedback autoregulation of RhIR plays a major role in *rhIR* expression.

It is also interesting to point out that the introduction of a *vfr* mutation into strain PW6882 (PAO1-WV, Table 1, Fig. 4a) reduces the expression of *rhIR*, but does not cause its complete silencing, showing that there is a significant *rhIR*

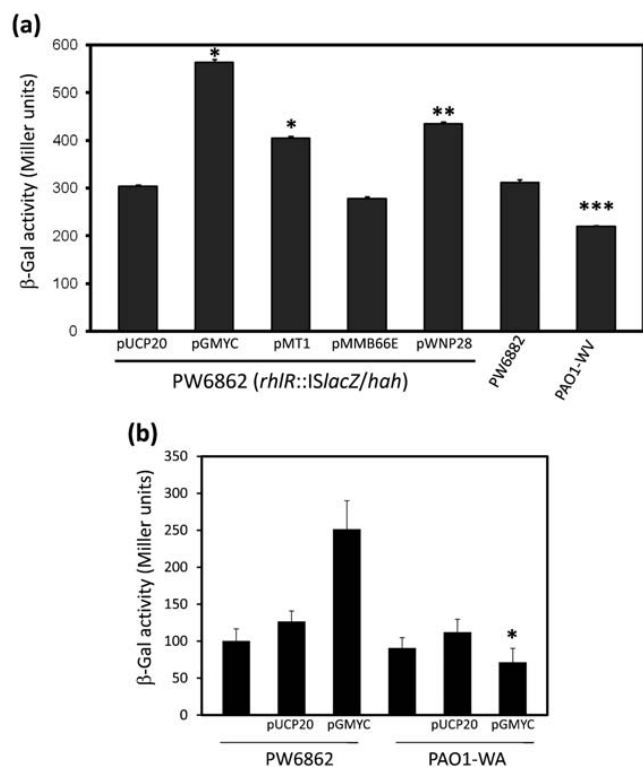


Fig. 4. *rhIR* is expressed from the *rhIA* promoter, forming a positive autoregulatory loop. (a) Expression of the *rhIR* promoter in the PAO1 chromosome background, using the transposon-insertion *rhIR* mutant (PW6882, Table 1), which has an in-frame *lacZ* fusion, in the presence of plasmids pGMYC, pMT1 and pWNP28, which express the RhlR, LasR and Vfr proteins, respectively, *in trans*. A PW6882 *vfr* mutant derivative (PAO1-WV, Table 1) was used as a control for the amount of *rhIR* expression that depends on Vfr and is independent of the RhlR positive autoregulatory loop. (b) The polarity of an *rhIA* mutation was determined by the expression of the same chromosomally encoded *rhIR-lacZ* fusion (PW6882) with an *rhIA::Gm* insertion (PAO-WA, Table 1) in the presence of plasmid pGMYC and the vector pUCP20. The statistical significance of the results was determined by Student's one-tailed *t*-test. The results obtained have a level of significance of $P < 0.001$ when compared with plasmid pUCP20 (*), of $P < 0.001$ when compared with plasmid pMMB66EH (**), and of $P < 0.001$ when compared with strain PW6882 in the case of panel (a); and of $P < 0.001$ when compared to PW6882/pGMYC (*) in the case of panel (b).

expression that is both Vfr-independent and LasR-independent (*lasR* is not expressed in a *vfr* mutant). The contribution to *rhIR* transcription in the *vfr* mutant of promoter 4 (repressed by Vfr) and the constitutive promoter 2 remains to be determined.

To further support the existence of the *rhIABR* operon we determined by RT-PCR the presence of a transcript extending from *rhIA* to *rhIR* (Fig. 5). The detection of this transcript further supports the existence of a positive autoregulatory loop in *rhIR* expression through activation

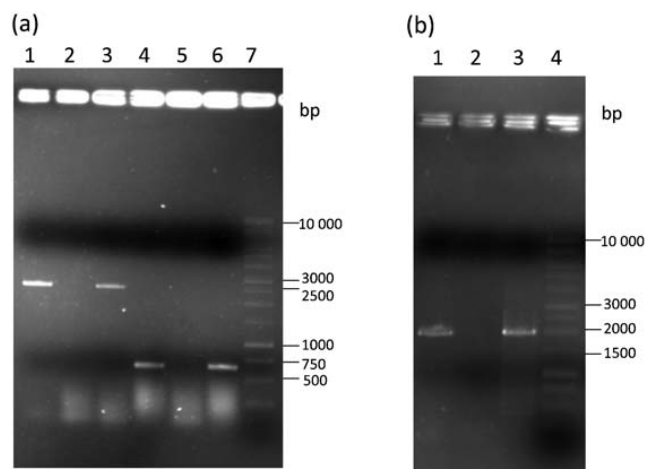


Fig. 5. Identification of the mRNA extending from *rhIA* to *rhIR* using RT-PCR. (a) Presence of the *rhIABR* transcript in wild-type strain PAO1 and its absence in the *rhIA* mutant PW6887. Lanes: 1, PCR product using PAO1 chromosomal DNA as template; 2, negative control consisting of RNA purified from PAO1 cells cultured in PPGAS medium to an OD_{600} of 1.5, incubated in conditions used to perform the RT-PCR, but lacking reverse transcriptase; 3, RT-PCR product from RNA purified from PAO1 cells cultured in PPGAS medium to an OD_{600} of 1.5 using primers F-*rhIA* and R-*rhIABR*; 4, RT-PCR product from the same RNA sample as used for lane 3, but using primers F-*rpoD* and R-*rpoD*; 5, RT-PCR product from RNA purified from PW6887 (*rhIA::ISphoA/hah*) cultured in PPGAS medium to an OD_{600} of 1.5 using primers F-*rhIA* and R-*rhIABR*; 6, RT-PCR product from the same RNA sample as used for lane 5, but using primers F-*rpoD* and R-*rpoD*; 7, DNA size standard. (b) Amplification by PCR of the RT-PCR product shown in lane 3 of (a) using primers R-*rhIABR* and F'-*rhIA*. Lanes: 1, PCR product using RT-PCR product of lane 3 as template; 2, reverse transcription reaction, where reverse transcriptase was omitted, as a negative control; 3, PCR product using PAO1 chromosomal DNA as template; 4, DNA size standard.

of the *rhIA* promoter. This observation also predicts that an *rhIA* mutant should have a reduction of RhlR concentration and could explain the reduced pyocyanin production of the *rhIA::Gm* mutant reported previously (Rahim *et al.* 2001). To support this hypothesis, we confirmed that indeed another *rhIA* mutant (PW6887, *rhIA::ISphoA/hah* with the transposon inserted in the opposite direction to *rhIA* transcription; Table 1) produced reduced amounts of pyocyanin: strain PAO1 produced $0.814 \pm 0.043 \mu\text{g ml}^{-1}$ while its *rhIA* mutant derivative produced $0.017 \pm 0 \mu\text{g ml}^{-1}$. Furthermore, introduction of plasmid pGMYC expressing *rhIR* from the *lac* promoter to strain PW6887 (*rhIA* mutant) fully restored its ability to produce pyocyanin ($1.11 \pm 0.017 \mu\text{g ml}^{-1}$).

Rhamnolipids have been reported to participate in the solubility of the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) that is involved in the regulation of pyocyanin (Calfee *et al.*, 2005), so the reduced pyocyanin production by *rhIA*

mutants could have been due to the lack of rhamnolipid production. However, the fact that pyocyanin production is restored in the *rhIA rhIR* double mutant by the expression *in trans* of *rhIR* shows that rhamnolipid production is not essential for the production of this phenazine.

These results suggest that the lack of pyocyanin production in the *rhIA* mutant is due to polarity of the mutation that results in reduced levels of RhIR and that expression of *rhIR* from a plasmid compensates for this reduction. The polarity of *rhIA* mutation on *rhIR* expression was shown by determining that in strain PAO-WA (PW6882 *rhIR* mutant with a Gm cassette inserted in *rhIA*, Table 1) the introduction of plasmid pGMYC expressing RhIR has no effect on *rhIR* expression (Fig. 4b). The polarity of the *rhIA::Gm* mutation on *rhIR* expression was confirmed by the absence of the transcript comprising the *rhIABR* operon in mutant PW6887 as determined by RT-PCR (Fig. 5).

Integrative model of *rhIR* transcriptional regulation

In this work we have shown that Vfr, LasR and RhIR have a role in the regulation of *rhIR* transcription and we propose a

kinetic model of *rhIR* expression that integrates all these elements throughout the *P. aeruginosa* growth curve (Fig. 6).

This working model is as follows. When *P. aeruginosa* is growing at an exponential rate, Vfr is produced at low levels (Heurlier *et al.*, 2003) and *rhIR* is transcribed at a reduced rate from promoter 2, which is constitutive, and from promoter 4 (Vfr is not bound to VBS4 and there is no repression of transcription of this promoter); there are low levels of RhIR and the *rhIAB* operon is not transcribed. During the transition from exponential to stationary phase, Vfr concentration increases (Heurlier *et al.*, 2003) and expression of both *lasR* and *rhIR* is activated through direct binding of this protein to VBSs. The increased LasR concentration also leads to increased expression of *lasI*, *rhII* and *rhIR*; when threshold RhIR and C4-HSL concentrations are achieved, the *rhIA* promoter is activated by RhIR/C4-HSL, which in turns leads to increased expression of *rhIR* by a positive-feedback autoregulatory loop, as shown in Fig. 6.

It remains to be determined whether the activation of *rhIR* transcription by Vfr is dependent on the interaction of this protein with cAMP or its independent of the binding of this cyclic nucleotide as has been shown for Vfr-dependent *lasR* activation (Fuchs *et al.*, 2010)

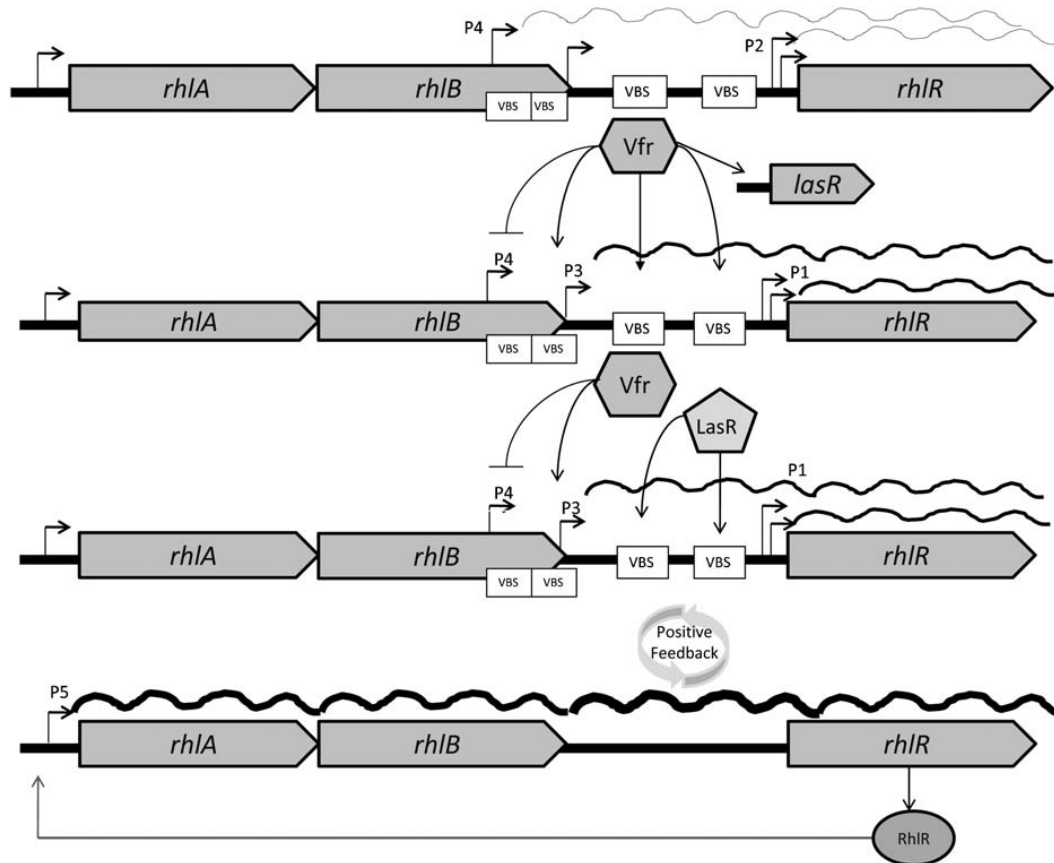


Fig. 6. Schematic model of the mechanism of *rhIR* expression in *P. aeruginosa*.

It has been shown recently that the PqsE enzyme has a stabilizing effect on RhlR. The mechanism of this activation is still unknown since the substrate of this hydrolase has not been identified, but its effect can be seen in the *E. coli* background (Farrow *et al.*, 2008). We did not address the role of PqsE transcriptional activation of *rhlR* in this work, since it has been reported that the effect of PqsE on RhlR activity is not at the level of transcription. However, we would expect that if the stabilization of RhlR by PqsE activity increases its concentration, this increment of RhlR concentration would result in the increased autoregulatory activation of *rhlR* caused by increased expression of the *rhlA* promoter.

The results presented in this work enhance our understanding of the very complex regulatory mechanisms involved in *rhlR* transcription and provide an integrative picture of the *P. aeruginosa* QS response. The understanding of this regulatory network is of key importance for the development of strategies to control *P. aeruginosa* acute infections.

ACKNOWLEDGEMENTS

Part of this work was financed by CONACyT (grant 50201) and by DGPA-UNAM PAPIIT (grant IN200707). This work represents G.C.'s PhD thesis done in the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM and he received a CONACyT scholarship during his studies. We thank Dr Susan West for providing plasmid pWNP28, and Dr George O'Toole for providing plasmid pMMB66EH. We are also grateful to Dr Rome Voulhoux for providing strain PAO6301 and to Dr Yeong-Jae Seok for strain SA2777.

REFERENCES

- Aiba, H., Adhya, S. & de Crombrughe, B. (1981). Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J Biol Chem* **256**, 11905–11910.
- Albus, A. M., Pesci, E. C., Runyen-Janecky, L. J., West, S. E. H. & Iglewski, B. H. (1997). Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**, 3928–3935.
- Calfee, M. W., Shelton, J. G., McCubrey, J. A. & Pesci, E. C. (2005). Solubility and bioactivity of the *Pseudomonas* quinolone signal are increased by a *Pseudomonas aeruginosa*-produced surfactant. *Infect Immun* **73**, 878–882.
- Casadaban, M. J. (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**, 541–555.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2172–2175.
- Elliott, T. (1992). A method for constructing single-copy *lac* fusions in *Salmonella typhimurium* and its application to the *hemA-prfA* operon. *J Bacteriol* **174**, 245–253.
- Essar, D. W., Eberly, L. & Crawford, I. P. (1990). Evolutionary differences in chromosomal locations of four early genes of the tryptophan pathway in fluorescent pseudomonads: DNA sequences and characterization of *Pseudomonas putida trpE* and *trpGDC*. *J Bacteriol* **172**, 867–883.
- Farrow, J. M., III, Sund, Z. M., Ellison, M. L., Wade, D. S., Coleman, J. P. & Pesci, E. C. (2008). PqsE functions independently of PqsR-Pseudomonas quinolone signal and enhances the *rhl* quorum-sensing system. *J Bacteriol* **190**, 7043–7051.
- Fox, A., Haas, D., Reimmann, C., Heeb, S., Filloux, A. & Voulhoux, R. (2008). Emergence of secretion-defective sublines of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 resulting from spontaneous mutations in the *vfr* global regulatory gene. *Appl Environ Microbiol* **74**, 1902–1908.
- Fuchs, E. L., Brutinel, E. D., Jones, A. K., Fulcher, N. B., Urbanowski, M. L., Yahr, T. L. & Wolfgang, M. C. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* Vfr regulator controls global virulence factor expression through cyclic AMP-dependent and -independent mechanisms. *J Bacteriol* **192**, 3553–3564.
- Fürste, J. P., Pansegrau, W., Frank, R., Blöcker, H., Scholz, P., Bagdasarian, M. & Lanka, E. (1986). Molecular cloning of the plasmid RP4 primase region in a multi-host-range *tacP* expression vector. *Gene* **48**, 119–131.
- Gilbert, K. B., Kim, T. H., Gupta, R., Greenberg, E. P. & Schuster, M. (2009). Global position analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing transcription factor LasR. *Mol Microbiol* **73**, 1072–1085.
- Heurlier, K., Dénervaud, V., Pessi, G., Reimmann, C. & Haas, D. (2003). Negative control of quorum sensing by RpoN (σ^{54}) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **185**, 2227–2235.
- Irani, V. R. & Rowe, J. J. (1997). Enhancement of transformation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by Mg^{2+} and heat. *Biotechniques* **22**, 54–56.
- Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C. & other authors (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14339–14344.
- Kanack, K. J., Runyen-Janecky, L. J., Ferrell, E. P., Suh, S. J. & West, S. E. (2006). Characterization of DNA-binding specificity and analysis of binding sites of the *Pseudomonas aeruginosa* global regulator, Vfr, a homologue of the *Escherichia coli* cAMP receptor protein. *Microbiology* **152**, 3485–3496.
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P. & Lazdunski, A. (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* **21**, 1137–1146.
- Lindsay, A. & Ahmer, B. M. M. (2005). Effect of *sdiA* on biosensors of *N*-acylhomoserine lactones. *J Bacteriol* **187**, 5054–5058.
- Medina, G., Juárez, K., Díaz, R. & Soberón-Chávez, G. (2003a). Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa rhlR*, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* **149**, 3073–3081.
- Medina, G., Juárez, K., Valderrama, B. & Soberón-Chávez, G. (2003b). Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J Bacteriol* **185**, 5976–5983.
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics*, pp. 352–355. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Morgan, A. F. (1979). Transduction of *Pseudomonas aeruginosa* with a mutant of bacteriophage E79. *J Bacteriol* **139**, 137–140.
- Nam, T. W., Park, Y. H., Jeong, H. J., Ryu, S. & Seok, Y. J. (2005). Glucose repression of the *Escherichia coli* *sdhCDAB* operon, revisited: regulation by the CRP*cAMP complex. *Nucleic Acids Res* **33**, 6712–6722.
- Pesci, E. C., Pearson, J. P., Seed, P. C. & Iglewski, B. H. (1997). Regulation of *las* and *rhl* quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**, 3127–3132.
- Preston, M. J., Seed, P. C., Toder, D. S., Iglewski, B. H., Ohman, D. E., Gustin, J. K., Goldberg, J. B. & Pier, G. B. (1997). Contribution of

proteases and LasR to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during corneal infections. *Infect Immun* **65**, 3086–3090.

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

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, A. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sappington, K. J., Dandekar, A. A., Oinuma, K.-I. & Greenberg, E. P. (2011). Reversible signal binding by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal receptor LasR. *MBio* **2**, e00011-11.

Schuster, M., Urbanowski, M. L. & Greenberg, E. P. (2004). Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15833–15839.

Simons, R. W., Houman, F. & Kleckner, N. (1987). Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**, 85–96.

Soberón-Chávez, G., Aguirre-Ramírez, M. & Ordóñez, L. G. (2005). Is *Pseudomonas aeruginosa* only “sensing quorum”? *Crit Rev Microbiol* **31**, 171–182.

Suh, S. J., Runyen-Janecky, L. J., Maleniak, T. C., Hager, P., MacGregor, C. H., Zielinski-Mozny, N. A., Phibbs, P. V., Jr & West, S. E. H. (2002). Effect of *vfr* mutation on global gene expression and catabolite repression control of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **148**, 1561–1569.

West, S. E. H., Sample, A. K. & Runyen-Janecky, L. J. (1994a). The *vfr* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and protease production, belongs to the cyclic AMP receptor protein family. *J Bacteriol* **176**, 7532–7542.

West, S. E. H., Schweizer, H. P., Dall, C., Sample, A. K. & Runyen-Janecky, L. J. (1994b). Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**, 81–86.

Williams, P. & Cámara, M. (2009). Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol* **12**, 182–191.

Zhang, Y. & Miller, R. M. (1992). Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas rhamnolipid* surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* **58**, 3276–3282.

Edited by: W. J. Quax

Dear Authors,

Please find enclosed a proof of your article for checking.

When reading through your proof, please check carefully authors' names, scientific data, data in tables, any mathematics and the accuracy of references. Please do not make any unnecessary changes at this stage. All necessary corrections should be marked on the proof at the place where the correction is to be made; please write the correction clearly in the margin (if in the text they may be overlooked).

Any queries that have arisen during preparation of your paper for publication are listed below and indicated on the proof. Please provide your answers when returning your proof.

Please return your proof by Fax (+44 (0)118 988 1834) within 2 days of receipt.

| Query no. | Query |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Author: Crp has been changed to CRP in the title, to correspond to the usage in the text; is this OK? |
| 2 | Author: please check the change from 'animals' to 'mammals' (made because insects and nematodes are also animals) |
| 3 | Author: please check the addition of 'promoted' before 'by Vfr' |
| 4 | Author: please check the change from 17.072 to 17 072 (i.e. 1000 times larger) |
| 5 | Author: the sentence 'Site-directed mutagenesis of <i>vfr</i> boxes (VBS)' has been deleted before 'To generate' because it seemed redundant; is this OK? |
| 6 | Author: should it be stated how the sequences were corroborated? |
| 7 | Author: should the sentence 'Activation of the <i>rhIR'</i> - <i>lacZ</i> fusion was also observed when a plasmid encoding CRP, instead of Vfr, was used' be followed by '(data not shown)' |
| 8 | Could not find a chapter title in a book chapter reference (in reference "Miller, 1972"). |
| 9 | Author: for strain MC4100, should (<i>argF-lacU169</i>) be (<i>argF-lac</i>)U169 as for strain DH5 α ? |
| 10 | Author: <i>las1</i> and <i>las3</i> have been changed to <i>rhIR-1</i> and <i>rhIR-3</i> here, for consistency with the text; is this OK? |
| 11 | Author: please check the addition of 'promoted' before 'by Vfr' |
| 12 | Author: the first bar in each group in panel (b) has no label. Please indicate what label should be added or add an explanation to the legend. |

SGM adopts a new way of ordering offprints

As a result of declining offprint orders and feedback from many authors who tell us they have no use for their free offprints, SGM has decided to phase out our practice of sending 25 free offprints to all corresponding authors.

We are also changing the way in which offprints are ordered. **When the final version of this article has been authorized for printing, you will receive an email containing a link to the SGM Reprint Service.** You can forward this email to your co-authors if you wish, so that they can order their own offprints directly, or to your finance or purchasing department, if orders are placed centrally.

When you click on the link in the email, you will be taken to an order page to place your offprint order. Like most online ordering sites, it will be necessary to set up an account and provide a delivery address while placing your order, if you do not already have an account. Once an account and delivery address have been set up, these details will be stored by the system for use with future orders. Payments can be made by credit card, PayPal or purchase order.

For an initial period, authors will be provided with a discount code that will allow them to order 25 free offprints, as well as any additional offprints they wish to purchase. This code will be valid for 90 days, and applies only to the paper for which it was issued. As all offprint orders will be despatched by courier from now on, there will be a charge for postage and packing, even on orders that consist only of free offprints.

Review authors will receive a discount code for up to 100 free offprints, as at present.

SUMMARY

- You can create or update your account at any time at <http://sgm-reprints.charlesworth.com/>
- You will be sent an email when the offprints of this paper are ready for ordering
- **You cannot order offprints of this paper before this email has been sent**, as your paper will not be in the system
- You will also receive a discount code that will allow you to order 25 free offprints (postage & packing applies)
- Offprints can be ordered at any time after publication, although the discount code is only valid for 90 days

The ordering details and discount code will be emailed to the author listed as the corresponding author on the journal's manuscript submission system. If your paper has been published (the final version, not the publish-ahead-of-print version) but you have not received your discount code, email reprints@sgm.ac.uk quoting the journal, paper number and publication details.

If you have any questions or comments about the new offprint-ordering system, email reprints@sgm.ac.uk