



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

**“Identificación de los genes del plásmido
pUM505 que participan en la virulencia de
Pseudomonas aeruginosa”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:

QFB. ERNESTO RODRÍGUEZ ANDRADE

**Doctora en ciencias en biología experimental Martha Isela
Ramírez Díaz**

Coasesor:

Doctor en ciencias bioquímicas Carlos Cervantes Vega

Morelia, Mich., Febrero 2015



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	5
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
1.2. Islas genómicas.....	6
1.2.1. Islas de patogenicidad.....	9
1.3. Factores de virulencia.....	10
1.3.1. Sistema de secreción tipo III.....	12
1.3.2. Sistema de “Quorum sensing”.....	13
II. ANTECEDENTES	16
2.1. Plásmido pUM505.....	16
2.1.1. Comparación de la PAI de pUM505 con las islas PAPI-1 y PAPI-2 de <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	18
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. HIPÓTESIS	22
V. OBJETIVOS	23
5.1. Objetivo general.....	23
5.2. Objetivos Específicos.....	23
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1. Medios de cultivo.....	25
7.2. Cepas.....	25
7.3. Vectores.....	26
7.4. Método de Casse para el aislamiento de DNA plasmídico.....	26
7.5. Extracción de DNA plasmídico por el método de columna.....	29
7.6. Tratamientos enzimáticos de DNA.....	30
7.7. Preparación de células electrocompetentes.....	31

7.8. Transformación por electroporación.....	32
7.9. Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina.....	32
7.10. Electroforesis en gel de agarosa.....	33
7.11. Amplificación por PCR.....	33
7.12. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.....	35
7.13. Ensayos de virulencia en hojas de lechuga.....	36
7.14. Cinéticas de crecimiento.....	36
7.15. Transferencia del plásmido pUM505 por conjugación.....	37
7.16. Pruebas de susceptibilidad.....	37
7.17. Análisis <i>in silico</i>	37
VIII. RESULTADOS.....	39
8.1. Participación del plásmido pUM505 en la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
8.2. Identificación de los genes de pUM505 involucrados en la virulencia.....	39
8.3. Participación de los <i>orfs</i> 1, 16, 42 y 110-111 de pUM505 en la virulencia.	52
8.4. Efecto del sistema Quorum-sensing en la virulencia generada por los <i>orfs</i> de pUM505.....	58
IX. DISCUSIÓN.....	64
X. CONCLUSIÓN.....	75
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura general de una isla genómica.....	8
Figura 2. Regulación de la virulencia y las interacciones entre los dos sistemas de Quorum sensing de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
Figura 3. Mapa genético del plásmido pUM505 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
Figura 4. Organización de las islas de patogenicidad PAPI-1 y PAPI-2 de <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	19
Figura 5. Análisis de las UFC de <i>P. aeruginosa</i> en el modelo de neumonía aguda de ratones.....	21
Figura 6. Vector pJET 1.2.....	27
Figura 7. Vector de clonación pUCP20.....	28
Figura 8. Participación de pUM505 en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> en hojas de lechuga.....	40
Figura 9. Estrategia experimental para obtención de la biblioteca de genes de pUM505.....	42
Figura 10. Análisis de restricción de los plásmidos recombinantes de la biblioteca de genes de pUM505.....	44
Figura 11. Distribución del tamaño de los fragmentos clonados.....	46
Figura 12. Virulencia de las transformantes de <i>E. coli</i> Top10 con la biblioteca de genes de pUM505.....	47
Figura 13. Análisis de la virulencia de las transformantes de <i>P. aeruginosa</i> con genes de la biblioteca de pUM505.....	48
Figura 14. Cinéticas de crecimiento de clonas de <i>P. aeruginosa</i>	49
Figura 15. Mapa genético de pUM505 con la localización y tamaño de los insertos de las clonas que incrementan la virulencia.....	50
Figura 16. Producto del PCR de los <i>orfs</i> de pUM505.....	53

Figura 17. Estrategia de la clonación y subclonación del <i>orf</i> 1.....	54
Figura 18. Estrategia de la clonación y subclonación del <i>orf</i> 16.....	55
Figura 19. Estrategia de la clonación y subclonación del <i>orf</i> 42.....	56
Figura 20. Estrategia de la clonación y subclonación de los <i>orfs</i> 110-111.....	57
Figura 21. Participación de los <i>orfs</i> 1, 16, 42 y 110-111 de pUM505 en la virulencia.....	59
Figura 22. Caracterización de las mutantes <i>lasI</i> y <i>lasI/rhII</i> transformadas con el plásmido pMU505.....	61
Figura 23. Análisis de la virulencia de las exconjugantes <i>lasI</i> y <i>lasI/rhII</i> con el plásmido pUM505.....	62
Figura 24. Análisis de la virulencia de las muntantes <i>lasI</i> y <i>lasI/rhII</i> con los plásmidos recombinantes de las clonas EH8, EH 24, EH 26 y EH 28.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	34
Tabla 2. <i>orfs</i> de pUM505 identificados en las clonas que incrementan la virulencia.....	51

RESUMEN

El plásmido pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *Pseudomonas aeruginosa* y tiene un tamaño de 123 kilobases (kb), posee una isla de patogenicidad (PAI) con 78 genes, de los cuales 64 han sido encontrados en las PAIs PAPI-1 y PAPI-2 de *P. aeruginosa* PA14, un aislado clínico más virulento que la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1. Sin embargo, no se ha determinado si pUM505 es capaz de incrementar la virulencia de *P. aeruginosa*. Además, se sabe que el sistema de “Quorum-sensing” regula varios procesos con base en la densidad celular, uno de los procesos regulados por este sistema es el de virulencia; existen estudios en donde al mutar los genes que codifican a las sintasas LasI y RhII de PAO1, ésta disminuye su virulencia. El objetivo del presente trabajo fue determinar si pUM505 incrementa la virulencia de PAO1 e identificar los genes responsables de conferir dicho fenotipo. Empleando el modelo de virulencia de hojas de lechuga se determinó que el plásmido incrementa la virulencia de PAO1. Posteriormente se generó una biblioteca de genes del plásmido pUM505 de 120 clonas en *Escherichia coli*, 15 de éstas mostraron un fenotipo virulento. Posteriormente los plásmidos recombinantes se transfirieron a PAO1, donde se encontró que los plásmidos recombinantes pEH 8, 24, 26 y 28 incrementaron la virulencia en ambas especies bacterianas. La transferencia de estos plásmidos en las mutantes *lasI* y *lasI/rhII* de *P. aeruginosa* no incrementó la virulencia, sugiriendo que los genes clonados en dichos plásmidos son regulados por el sistema de “Quorum-sensing”. Se obtuvo la secuencia de los fragmentos clonados en dichos plásmidos recombinantes, identificando a los *orfs* 2, 17, 26, 94 y 111 de pUM505, como

homólogos a genes previamente relacionados con virulencia. Además, se encontraron los *orfs* 93 y 97, localizados fuera de la PAI de pUM505. Adicionalmente se identificaron los *orfs* 1 y 16, no relacionados previamente en patogenicidad y al *orf* 42 ya relacionado a virulencia, los cuales al ser transferidos a *E. coli* incrementaron su virulencia, solamente el *orf* 42 incrementó la virulencia de *P. aeruginosa*. Con los resultados obtenidos se puede concluir que genes del plásmido pUM505 incrementan la virulencia de *E. coli* y *P. aeruginosa* y que los mecanismos de virulencia codificados por estos genes pueden ser modulados por el sistema de “Quorum-sensing”.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, pUM505, isla de patogenicidad, virulencia.

Abstract

Plasmid pUM505 was isolated from a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* and has a size of 123 kilobases (kb), has a pathogenicity island (PAI) with 78 genes, of which 64 have been found in the PAIs PAPI-1 and PAPI 2 from *P. aeruginosa* PA14, a clinical isolate more virulent than the reference strain *P. aeruginosa* PAO1. However, it has not been determined whether pUM505 is able to increase the virulence of *P. aeruginosa*. Furthermore, it is known that the system "Quorum-sensing" regulates various processes based on the cell density, one of the processes covered by this system is the virulence; there are studies in which the mutated genes encoding the synthases LasI and RhII of PAO1, it decreases their virulence. The aim of this study was to determine whether pUM505 increases the virulence of PAO1 and identify the genes responsible for this phenotype. Using the model of virulence of lettuce leaves was determined that the plasmid increases the virulence of PAO1. Subsequently a gene library of plasmid pUM505 was generated, 120 clones were generated in *Escherichia coli*, 15 of these showed a virulent phenotype. Then the recombinant plasmids were transferred to PAO1, which found that recombinant plasmids PEH 8, 24, 26 and 28 increased virulence in both bacterial species. The transfer of these plasmids into the *lasI* and *lasI/rhII* mutants of *P. aeruginosa* don't increased the virulence, suggesting that the cloned genes in these plasmids are regulated by the system of "Quorum-sensing". The sequence of the cloned fragments in these recombinant plasmids was obtained, identifying the *orfs* 2, 17, 26, 94 and 111 from pUM505 as previously homologous

to genes related to virulence. In addition, *orfs* 93 and 97 were found, located outside the PAI of pUM505. Additionally the *orfs* 1 and 16 not related to virulence and *orf* 42 previously related to virulence, were transferred to *E. coli* increased virulence, only *orf* 42 increased the virulence of *P. aeruginosa*. With the results obtained it can be concluded that the plasmid genes pUM505 increase the virulence of *E. coli* and *P. aeruginosa* and mechanisms encoded by these genes can be modulated by the system "Quorum-sensing".

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, pUM505, island of pathogenicity, virulence.

INTRODUCCIÓN

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa ampliamente distribuida en el ambiente, incluyendo lagos, ríos, suelos y plantas (Green y col., 1974; Rhame, 1979); esta puede utilizar el nitrógeno como un aceptor de electrones para respirar bajo condiciones anaeróbicas, tiene un mínimo de requerimiento nutrimental y puede crecer a temperaturas arriba de 42 °C. Además, *P. aeruginosa* puede infectar a diferentes organismos, incluyendo levaduras (Hogan y Kolter, 2002), al nematodo *Caenorhabditis elegans* (Mahajan-Miklos y col., 1999), insectos (Jander y col., 2000), plantas (Elrod y Braun, 1942; Rahme y col., 1995) y mamíferos (Glazebrook y col., 1978; Hammer y col., 2003). Así mismo, se ha descrito que esta bacteria emplea los mismos determinantes de virulencia para infectar diferentes hospederos, desde plantas hasta humanos (Fajardo y col., 2008). En humanos, esta bacteria ha sido considerada como un patógeno oportunista y es una causa significativa de infecciones agudas (neumonía adquirida en hospitales, infecciones del tracto urinario e infecciones en heridas), así como de infecciones crónicas (infecciones respiratorias en individuos con fibrosis quística) (Battle y col., 2008). El genoma de *P. aeruginosa* tiene dos características que le permite explorar diferentes nichos ambientales e infectar un amplio rango de hospederos. Estos son: su genoma tiene un tamaño aproximado de 6.3 megabases (Mb) (Stover y col., 2000), uno de los más grandes entre las bacterias, lo que le confiere versatilidad medioambiental; y que contiene un gran

número de islas genómicas. Cerca del 90 % del cromosoma de *P. aeruginosa* está conservado entre las diferentes cepas (Wolfgang y col., 2003), pero insertado dentro del genoma “core”, están las islas genómicas, las cuales pueden o no estar presentes en diferentes cepas (Schmidt y col., 1996). Sin embargo, a pesar de la aparente similitud genética entre diversas cepas de *P. aeruginosa*, existen diferencias en el fenotipo de patogenicidad que son debidas a los genes de las islas genómicas específicas de cada cepa (Lee y col., 2006). Una de las principales cepas usadas en el laboratorio es *P. aeruginosa* PAO1, ésta fue aislada de una herida, siendo la primer cepa de *P. aeruginosa* secuenciada y es ampliamente usada en estudios de investigación (Holloway, 1955). El genoma de PAO1 posee un gran número de genes involucrados en la regulación, catabolismo, transporte y expulsión de factores de virulencia, además de codificar proteínas de membrana involucradas en adhesión, motilidad y eflujo de antibióticos, al igual que varios sistemas de quimiotaxis (Stover y col., 2000).

1.2. Islas genómicas

Las islas genómicas (IG) son reconocidas como segmentos de DNA discretos entre cepas cercanas, sin embargo, éstas han sido más estudiadas debido a que contribuyen a la adaptación y diversificación de los microorganismos, teniendo así un impacto significativo en la plasticidad genómica y la evolución, en la diseminación de genes involucrados en resistencia a antibióticos y en la virulencia (Juhas y col., 2008). Algunas de las IGs son capaces de integrarse dentro del cromosoma del hospedero, así como transferirse a un nuevo hospedero por transposición, conjugación o transducción (Juhas y col., 2008). Las características

principales de una isla genómica son: 1) usualmente son regiones de DNA que tienen tamaños entre 10 a 200 kilobases (kb); 2) éstas son reconocidas por el contenido de nucleótidos de guanina y citosina (GC), que comúnmente difieren del resto del cromosoma; 3) están a menudo insertadas junto a genes que codifican para tRNA, en tales casos éstas podrían ser elementos integrativos y conjugativos; 4) a menudo están flanqueadas por repetidos invertidos perfectos o casi perfectos (RI) (Schmidt y Hensel, 2004); 5) en ocasiones contienen genes que codifican integrasas o factores relacionados a sistemas de conjugación de plásmidos o fagos involucrados en la transferencia de las IGs; 6) a veces contienen elementos de inserción o transposones, los cuales podrían estar implicados en la movilización de material genético (Buchrieser y col., 1998; Gal-Mor y Finlay, 2006) y 7) las islas algunas veces contienen genes que proporcionan una ventaja adaptativa para la bacteria hospedera. En la **Figura 1**, se muestra la estructura general de una isla genómica. Se ha descrito que las IGs surgieron evolutivamente, esto se puede observar debido a la aparición de superfamilias de elementos análogos al genoma “core” (Juhás y col., 2007; Vernikos y Parkhill, 2008). Existen algunos ejemplos de IGs encontradas en diferentes cromosomas bacterianos, una de ellas es la isla CMGI-1, encontrada en *Cupriavidus metallidurans* “CH34” y en *Cupriavidus campinensis*; ésta fue la primer isla genómica que atrajo la atención de los investigadores, debido a que se encontró en varias cepas aisladas de ambientes contaminados con aguas negras y metales pesados (Larbig y col., 2002). Otra IG es PAGI-2C de 109 kb, identificada en *P. aeruginosa* “Clone C”, aislada de pacientes con fibrosis quística y en *C. metallidurans* “CH34” (Klockgether y col., 2007).

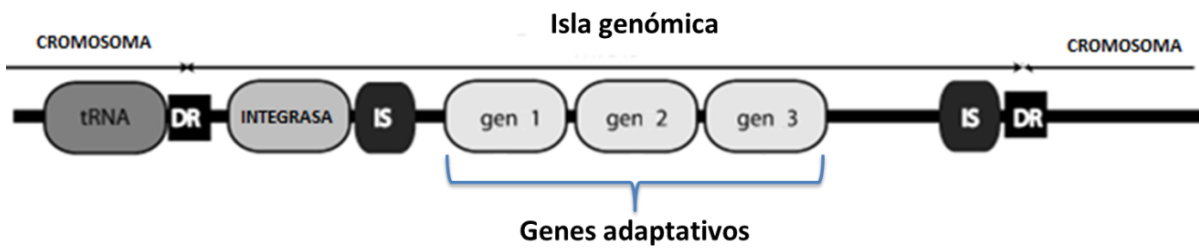


Figura 1. Estructura general de una isla genómica. Esquema de la estructura general de una isla genómica, en donde se representan sus principales características: (IS) secuencias de inserción en los extremos de la isla; (DR) secuencias de remoción; gen que codifica una integrasa; comúnmente junto a genes que codifican tRNA; genes adaptativos (Juhas y col., 2008).

1.2.1. Islas de patogenicidad

Cuando las IGs, contienen genes que codifican determinantes de virulencia, como toxinas, invasinas, adhesinas, proteínas efectoras, etc., son referidas como islas de patogenicidad (PAI) (Dobrindt y col., 2004). Este concepto de isla de patogenicidad se estableció a finales de 1980 por Hacker quien investigó las bases genéticas de la virulencia de las cepas uropatógenas de *E. coli* UPEC 536 y J96 (Knapp y col., 1986; Hacker y col., 1990), se identificaron segmentos similares de DNA con más de un gen ligado a virulencia (Low y col., 1984; High y col., 1988; Hacker y col., 1990). Sin embargo, la observación de que incluso un evento simple de eliminación resultaba en la pérdida de grupos de genes ligados a la virulencia junto con segmentos adicionales de DNA de más de 30 kb, permitió la definición de “isla de DNA patogénica” que posteriormente se le llamó “isla de patogenicidad” (Hacker y col., 1990; Blum y col., 1994). Hacker adicionalmente demostró que la eliminación de una PAI permite la pérdida de un fenotipo de patogenicidad, lo que sugirió que tales eliminaciones son mecanismos genéticos que modulan la virulencia de las bacterias (Hacker y col., 1983; Knapp y col., 1985; Hacker y col., 1990). Un ejemplo bien descrito de isla de patogenicidad que contribuye en la variación de la virulencia en cepas *P. aeruginosa* es la familia de las islas que contienen al gen *exoU* (Kulasekara y col., 2006), el cual codifica la proteína efectora tipo III ExoU, la cual presenta un efecto citotóxico *in vitro*. Además, en estudios clínicos, la presencia de esta toxina se asocia con un resultado clínico negativo entre los pacientes con infección por *P. aeruginosa* (Finck-Barbancon y col., 1997; Hauser y col., 1998; Sato y Frank, 2004). La isla PAGI-1 tiene un

tamaño de 49 kb y fue la primer isla de patogenicidad identificada en *P. aeruginosa* (Liang y col., 2001). Además, se han identificado otras islas de patogenicidad, entre ellas las islas PAPI-1 y PAPI-2, las cuales se identificaron en un aislado clínico altamente virulento: *P. aeruginosa* PA14 (PA0976.1) (He y col., 2004).

1.3. Factores de virulencia

Los patógenos bacterianos infectan a una amplia variedad de hospederos, en todos los casos, los patógenos pueden tener la capacidad para reconocer, asociarse con la explotación de la reserva de nutrientes y combatir las respuestas de defensas de su hospedero específico (Rahme y col., 2000). Para acoplarse a estas tareas, los patógenos usan un arsenal extenso de factores relacionados a virulencia. Muchos de los factores de virulencia en bacterias son específicos para un hospedero (Finlay y Falkow, 1997). Sin embargo, se han revelado características comunes de las respuestas de defensa del hospedero en contra de patógenos de plantas, insectos y mamíferos (Kopp y Medzhitov, 1999). Usando a la cepa de *P. aeruginosa* PA14, se evidenció que esta bacteria usa un subconjunto de factores de virulencia para provocar la enfermedad tanto en plantas (*A. thaliana*), como en mamíferos (ratones) (Rahme y col., 1995; Finlay y col., 1999; He y col., 2004), en *C. elegans* (Mahajan-Miklos y col., 1999; Tan y col., 1999; Tan y Ausubel, 2000), en el insecto *Galleria melonella* (Jander y col., 2000), así como en *Drosophila melanogaster* (Lutter y col., 2012).

Los factores de virulencia de *P. aeruginosa* facilitan la invasión de tejidos y la propagación, en la que se incluyen al pilus, al flagelo, endotoxinas, exotoxinas,

factores de permeabilidad vascular y una variedad de enzimas secretadas (Fink, 1993). Las proteasas de *P. aeruginosa* degradan diversas proteínas del hospedero y tienen un efecto destructivo directo en los tejidos (Kawaharajo y col., 1975); un ejemplo es la elastasa (LasB), una metaloproteasa con baja especificidad de sustrato, que degrada las proteínas del hospedero, tales como elastina, colágeno, transferinas e inmunoglobulinas (Galloway, 1991). La elastasa actúa con las proteasas LasA y las proteasas alcalinas que causan una elastolisis eficiente, la cual es requerida para el daño del tejido asociado con la patogénesis de *P. aeruginosa* (Peters y Galloway, 1990).

Otro ejemplo de factor de virulencia de *P. aeruginosa* es la cápsula de alginato, la cual juega un rol esencial en la infección pulmonar crónica en pacientes con fibrosis quística (Ohman y col., 1980). Finalmente, los lipopolisacáridos han sido reportados como un factor importante de virulencia (Pitt, 1989). Algunos de los factores de virulencia son regulados por factores externos o internos de la célula; por ejemplo, la fosfolipasa C es regulada por la disponibilidad de fosfato (Pritchard y Vasil, 1986; Shortridge y col., 1992), mientras que la exotoxina A y la elastasa son reguladas por la concentración de hierro en el medio de crecimiento (Grant y vasil, 1986; Iglewski y col., 1990). Además, la producción de un gran número de exoproductos, incluyendo elastasa, proteasa alcalina, la proteasa LasA, hemolisina, piocianina y ramnolípidos son dependientes de la densidad celular y son regulados por la llamada cascada de “Quorum-sensing” (Pesci e Iglewski, 1997). Esta cascada regula la producción de una variedad de factores específicos relacionados con virulencia, involucrándola en la diferenciación de biopelículas en *P. aeruginosa* (McLean y col., 1997; Davies y col., 1998). Otro factor de virulencia

es la piocianina, una fenazina color azul verdoso (Fuqua y col., 1994; Pesci e Iglewski, 1997); este metabolito secundario tiene actividad en contra de varias especies de bacterias, hongos y protozoarios, su efecto es atribuido a su potencial activo redox (Hassan y Fridovich, 1980; Sorensen y col., 1983).

1.3.1. Sistema de secreción tipo III

Muchas especies bacterianas aprovechan los sistemas especializados de secreción para transferir macromoléculas a través de las membranas. Estos sistemas de secreción están organizados dentro de seis grandes grupos, llamados Tipo I, II, III, IV, V, y VI (Thanassi y Hultgren, 2000; Henderson y col., 2004; Mougous y col., 2006). El sistema de secreción ancestral relacionado a la maquinaria de conjugación bacteriana, es referido como el sistema de secreción tipo IV (T4SS) (Lawley y col., 2003; Christie y col., 2005); este sistema es único entre otros tipos de sistemas de secreción bacterianos debido a su capacidad para transferir tanto proteínas como complejos nucleoproteínicos. La mayoría de los patógenos usan una combinación de varios sistemas de secreción proteica para la invasión exitosa de sus respectivos hospederos. Además, el impacto de los sistemas de secreción en bacterias virulentas puede variar en diferentes patógenos. Una función esencial en la patogenicidad a menudo ha sido asignado al sistema de secreción tipo III (SST3), que no sólo realiza la secreción de proteínas dentro del medio, sino también la translocación a través de la membrana de las células hospederas eucarióticas de proteínas bacterianas, llamadas proteínas efectoras al citosol (Rosqvist y col., 1991; Sory y Cornelis, 1994; Rosqvist y col., 1995; Cornelis y Wolf, 1997). Esta familia de proteínas de

transporte permite al patógeno interferir con las vías metabólicas de la célula hospedera para su propio beneficio. El SST3 es un complejo de ensamblaje que requiere la función de más de 20 proteínas para su actividad. La translocación de tales proteínas efectoras dentro de las células hospederas eucarióticas es la base para la interferencia específica con las funciones celulares, resultando en la invasión de la célula hospedera, inactivación de las células fagocíticas, apoptosis, y la interferencia con los procesos de transporte intracelular. Esta forma de translocación de proteínas requiere el contacto entre el patógeno y la célula blanco. La translocación dependiente del SST3 puede ser observada en patógenos extracelulares vía la membrana citoplasmática, de la misma manera que lo realizan los patógenos intracelulares, vía la membrana fagosomal (Büttner, 2012).

1.3.2. Sistema de “Quorum sensing”

La comunicación célula a célula por medio de moléculas difusibles permite que las bacterias desencadenen respuestas coordinadas para lograr resultados que de otro modo resultarían imposibles para una sola célula (Jiménez y col., 2012). El “Quorum-sensing” (QS) es considerado un mecanismo de comunicación entre bacterias que permite regular procesos importantes como la formación de biopelículas, la producción de metabolitos secundarios, la expresión de mecanismos de resistencia al estrés y la expresión de factores de virulencia (Barreto, 2011). Tales fenómenos se llevan a cabo a través de mecanismos de autoinducción de señales químicas presentes tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas (Flores y col., 2011). Las N-Acil homoserina lactonas

(AHLs) fueron las primeras señales bacterianas célula-célula descubiertas, además de que son las moléculas de comunicación más estudiadas (Jiménez y col., 2012). Un gran número de bacterias Gram negativas producen y usan estas señales para controlar y regular la expresión de genes de una manera dependiente de la densidad celular (Fuqua y Greenberg, 1998; Whitehead y col., 2001; Withers y col., 2001). En general, las AHLs consisten en ácidos grasos, los cuales varían en longitud, ligados a través de un enlace peptídico a la homoserina lactona. En *P. aeruginosa* coexisten dos sistemas AHL: Las y Rhl.

El sistema Las produce y responde a N-3-oxo-dodecanoil homoserina lactona (3-oxo-C₁₂-HSL), la cual es producida por la sintasa LasI y es reconocida por el regulador transcripcional LasR (Passador y col., 1993; Rampioni, 2007). Este sistema controla la producción de múltiples factores de virulencia involucrados en infecciones agudas y daño a las células hospederas, incluyendo a LasA, LasB, elastasas, exotoxina A y la proteasa alcalina (Toder y col., 1991; Gambello y col., 1993; Jones y col., 1993; Passador y col., 1993).

El segundo sistema, el Rhl, produce y responde a N-butanoil homoserina lactona (C₄-HSL) (Pearson y col., 1995); esta molécula es generada por la sintasa RhlI y es reconocida por el regulador transcripcional RhlR, este complejo regula la expresión de varios genes, incluyendo genes responsables de la producción de rhamnolípidos y reprimiendo genes de respuesta para ensamblaje y función del SST3 (Bleves y col., 2005). Existe una relación entre los sistemas Las y Rhl: el sistema Las controla al sistema Rhl, el complejo 3-oxo-C₁₂-HSL-LasR regula directamente la transcripción de RhlR (Latifi y col., 1996) (**Figura 2**).

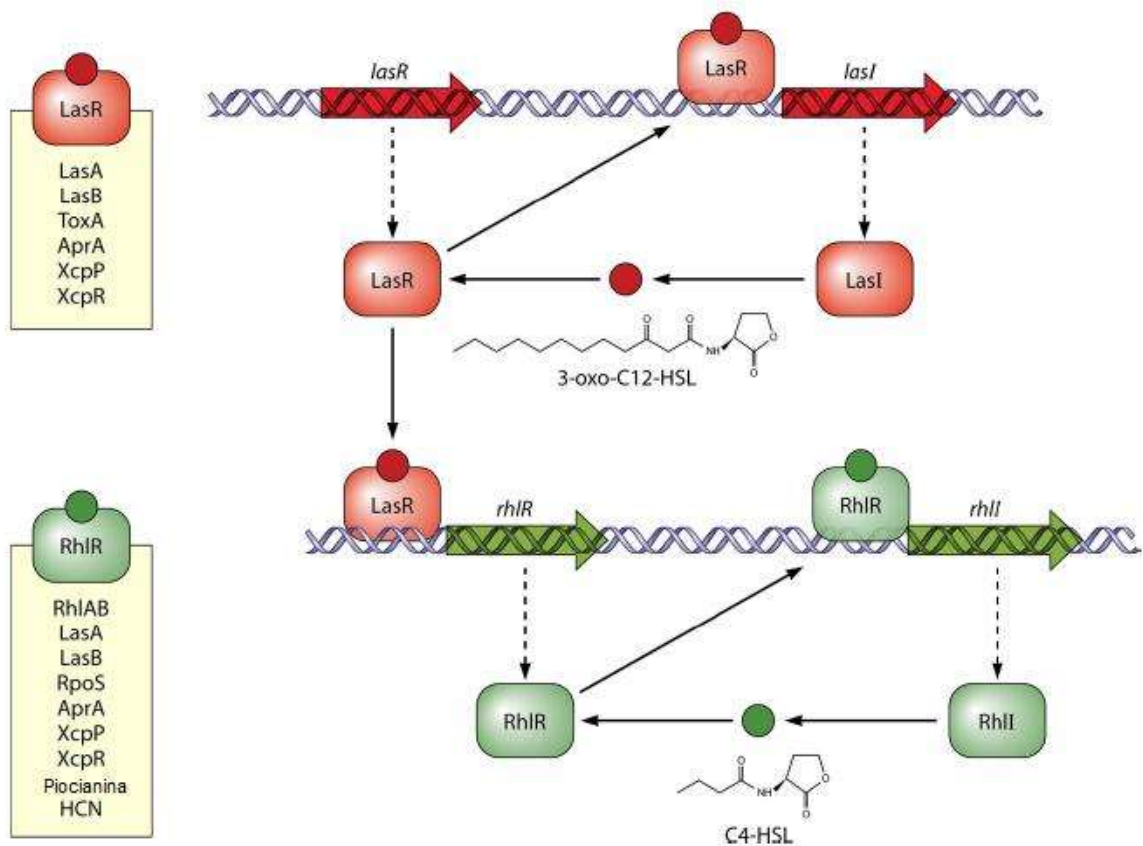


Figura 2. Regulación de la virulencia y las interacciones entre los dos sistemas de Quorum sensing de *Pseudomonas aeruginosa*. Después de que se produjo una concentración umbral del 3-oxo-C12-HSL, el complejo 3-oxo-C12-HSL-LasR se une a las regiones promotoras de múltiples genes, activando o reprimiendo la transcripción. Entre los genes regulados positivamente por este complejo son *lasI*, que aumenta la producción de LasI (efecto de autoinducción), y *rhIR*, lo que aumenta la producción de RhIR, regulador transcripcional de *rhII*, produciendo RhII, el cual produce a C4-HLS. Los factores de virulencia regulados por cada respectivo complejo receptor-ligando se detallan en los recuadros de la izquierda (Jiménez y col., 2012).

ANTECEDENTES

2.1. Plásmido pUM505

El plásmido conjugativo pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* de un paciente hospitalizado, y se determinó que es capaz de conferir resistencia a cromato y mercurio (Cervantes y Ohtake, 1988). Recientemente, nuestro grupo de trabajo realizó la secuenciación y el análisis de la secuencia del plásmido pUM505, determinando que éste es un replicón circular que posee 123,322 pares de bases (pb) y que contiene 138 regiones codificantes (Ramírez-Díaz y col., 2011) (**Figura 3**).

Del total de los genes de pUM505, 64 codifican proteínas con función desconocida (proteínas hipotéticas, PH), 15 codifican a elementos móviles, 13 están relacionados con transferencia, 13 son de resistencia a metales, 13 están relacionados con el metabolismo y 5 se han implicado en la regulación transcripcional, entre otros (Ramírez-Díaz y col., 2011). pUM505 presenta dos regiones bien definidas, la primer región, de ~67 kb, que corresponde a una isla de patogenicidad (PAI) y la segunda región, de ~31 kb, corresponde a una GI que contiene genes de resistencia a metales. La PAI de pUM505 consiste de 78 marcos de lectura abiertos (*orfs* 1-51 y 112-138) de los cuales 64 se han encontrado en las islas de patogenicidad PAPI-1 y PAPI-2 de *P. aeruginosa* PA14 (He y col., 2004).

La PAI de pUM505 contiene genes de replicación del DNA y de la transferencia conjugativa, así como 41 genes que codifican PHs. La PAI posee el operón *pil* compuesto por genes que codifican a proteínas involucradas en la biogénesis de

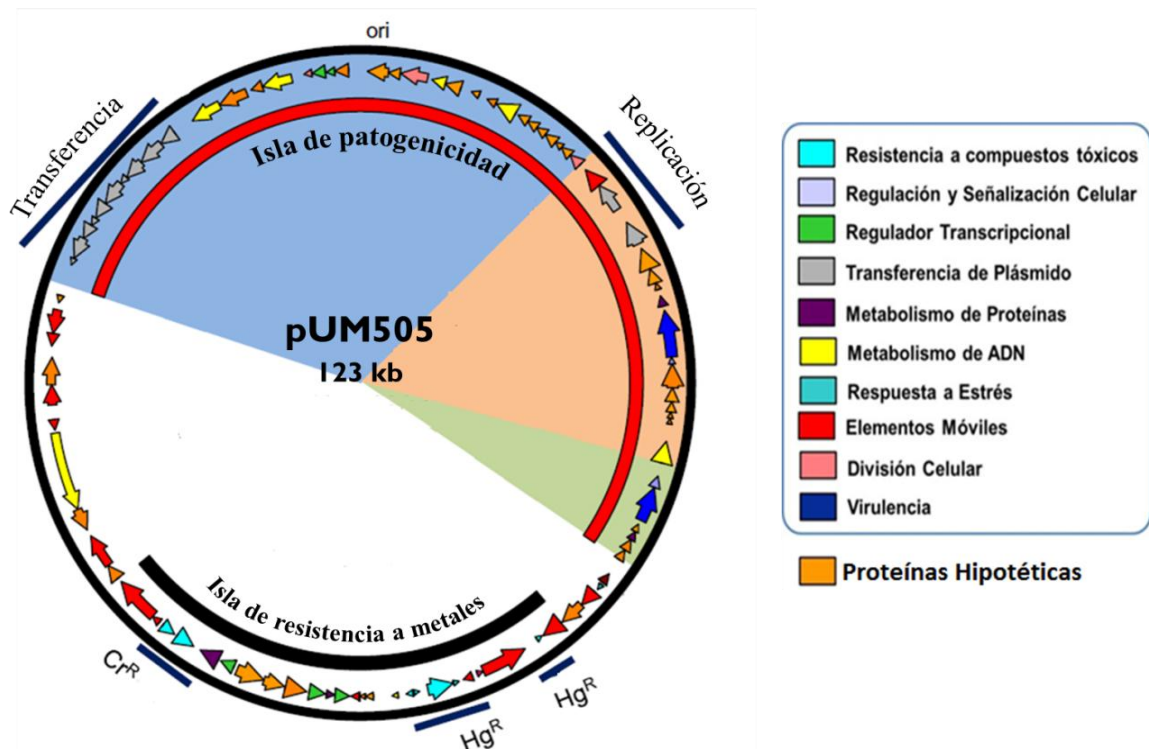


Figura 3. Mapa genético del plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa*.

Las regiones codificantes deducidas son mostradas con flechas o puntas de flecha indicando la dirección de la transcripción. Las posibles funciones de las proteínas codificadas están representadas de acuerdo al color del cuadro del lado derecho. Dos principales regiones del plásmido son indicadas: (1) La isla de patogenicidad (barra roja) y (2) la Isla de resistencia a metales pesados (barra negra). La isla de patogenicidad tiene una estructura tipo mosaico, que consiste de tres bloques, los cuales son mostrados en colores azul, rosa y verde. El origen de replicación se indica (ori). Se muestran los genes involucrados en la transferencia conjugativa y replicación. Los operones de resistencia a mercurio (Hg^R) y a cromato (Cr^R) están indicados con barras azules (Modificada de Ramírez-Díaz y col., 2011).

un pilus tipo IV, estructura esencial para la transferencia de plásmidos (Juhás y col., 2008) y que es usado para la adhesión de bacterias patógenas a células epiteliales, promoviendo la relación patógeno–célula hospedera (He y col., 2004). pUM505 se ha clasificado como un miembro de la familia de plásmidos tipo Incl, que se han encontrado con mayor frecuencia en cepas de *E. coli* patógenas que en cepas comensales (Johnson y col., 2007).

2.1.1. Comparación de la PAI de pUM505 con la isla PAPI-1 y PAPI-2 de *P.*

***aeruginosa* PA14**

El genoma de *P. aeruginosa* PA14 fue secuenciado, esta cepa se utiliza como cepa de referencia para la virulencia y ha servido para determinar la contribución de factores de virulencia (Lee y col., 2006). *P. aeruginosa* PA14 tiene dos islas de patogenicidad bien caracterizadas: PAPI-1 con un tamaño aproximado de 108 kb y PAPI-2 con un tamaño aproximado de 11 kb (He y col., 2004) (**Figura 4**). Con el uso de análisis *in silico*, se determinó que 64 de los *orfs* de la PAI de pUM505 tienen homología con los de las islas PAPI-1 y PAPI-2 de *P. aeruginosa* PA14, mostrando valores de 90% o más de identidad.

Como se mencionó, la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 es una cepa patógena, aislada de un caso clínico. Sin embargo, se ha demostrado que *P. aeruginosa* PA14 es una cepa más virulenta en un gran número de modelos de infección, como invertebrados, mamíferos y plantas (Rahme y col., 1995; He y col., 2004; Rahme y col., 2000; Kukavica-Ibrulj y col., 2008). Esto puede deberse a las islas cromosomales ya mencionadas anteriormente. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron las eliminaciones de las islas PAPI-1 y PAPI-2 de manera individual, así

como conjuntas, y utilizando un modelo de infección de ratones con neumonía aguda se cuantificaron las UFC de los diferentes tejidos para ver la diseminación de las bacterias y se observó que PA14 con la eliminación de PAPI-2 (Δ PAPI-2) y PA14 con la eliminación de ambas islas (Δ 1 Δ 2), fueron menos virulentas respecto a PA14 con las dos islas, concluyendo que las islas de patogenicidad de *P. aeruginosa* PA14 funcionan de manera conjunta e individual en el incremento de la virulencia (**Figura 5**).

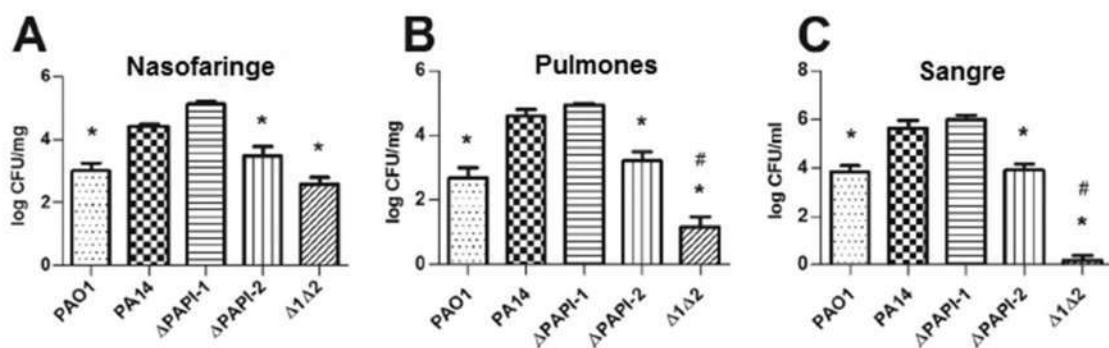


Figura 5. Análisis de las UFC de *P. aeruginosa* en el modelo de neumonía aguda de ratones. *P. aeruginosa* PAO1; *P. aeruginosa* PA14 silvestre; PA14 con la eliminación de PAPI-1(Δ PAPI-1); PA14 con la eliminación de PAPI-2 (Δ PAPI-2) y PA14 con la eliminación de ambas islas (Δ 1 Δ 2) respectivamente. Las barras de error representan los errores estándar de las medias. n=10 (Harrison y col., 2010).

JUSTIFICACIÓN

El plásmido pUM505 posee una isla de patogenicidad similar a las islas cromosómicas PAPI-1 y PAPI-2 de *P. aeruginosa* PA14, sin embargo, su función se desconoce. Por lo que es de interés determinar su posible participación en la virulencia de *P. aeruginosa*, así como identificar los genes que confieren este fenotipo.

HIPÓTESIS

Genes localizados en el plásmido pUM505 participan en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

OBJETIVOS

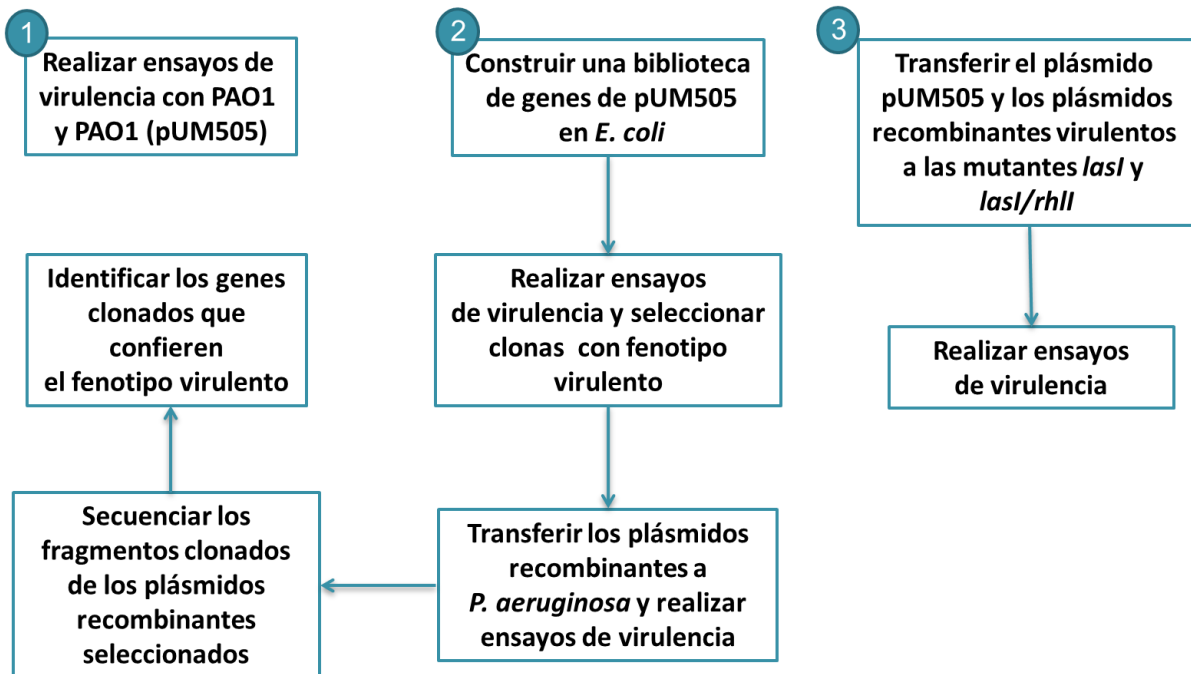
5.1. Objetivo general

Determinar la participación del plásmido pUM505 en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

5.2. Objetivos Específicos

1. Determinar que la presencia del plásmido pUM505 aumenta la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Identificar los genes de pUM505 involucrados en la virulencia.
3. Determinar que los genes de pUM505 involucrados en virulencia son dependientes del sistema de “Quorum sensing”.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Medios de cultivo

1. Caldo Luria-Bertani (CL): NaCl 1%, peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5%.
2. Agar Luria-Bertani (AL): se le agregó 1.5% de agar bacteriológico al caldo Luria-Bertani.
3. Medio M9: Glucosa 20 mM, MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 0.1 mM, mezcla de sales M9 1%. (Na₂HPO₄ 0.6%, KH₂PO₄ 0.3%, NaCl 0.05%, NH₄Cl 0.1%).
4. Caldo nutritivo: 0.8% medio deshidratado CN (BD Bioxon).

7.2. Cepas

- *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Holloway, 1955). Cepa empleada como receptora del plásmido pUM505 y de los plásmidos recombinantes derivados del vector pUCP20.
- *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (pUM505) Cr^R, Hg^R, Sm^R. Cepa que se utilizó para obtener el DNA molde para la amplificación por PCR de los genes de interés, y para obtener el DNA plasmídico para la obtención del banco (Díaz-Magaña 2011, datos no publicados).
- *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (Rahme y col., 1995) Biblioteca Ausubel. Cepa altamente virulenta.
- Mutante *Pseudomonas aeruginosa lasl*. Derivada de PAO1, Tc^R. (Pearson y col., 1995). Donada por el Dr. Jesús Campos García, Laboratorio de

Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas,
U.M.S.N.H.

- Doble mutante *Pseudomonas aeruginosa lasI/rhlI*. Derivada de *lasI*, Tc^R. Donada por el Dr. Jesús Campos García.
- *Escherichia coli* TOP10. (Dufree y col., 2008). Cepa empleada como receptora de los plásmidos recombinantes del vector pJET 1.2/blunt y pUCP20.

7.3. Vectores

1. pJET 1.2/Blunt (Fermentas). Vector de recuperación de productos de PCR, confiere resistencia a Am^R (**Figura 6**).
2. pUCP20 (West y col., 1994). Vector binario que se utilizó para la expresión de los genes de interés, confiere resistencia a Am^R y Cb^R (**Figura 7**).

7.4. Método de Casse para el aislamiento de DNA plasmídico

Se incubó un matraz con 250 ml de CL inoculado con la cepa *P. aeruginosa* (pUM505) durante toda la noche a 37 °C con agitación constante. Se centrifugó el cultivo bacteriano a 8000 rpm a 4 °C durante 10 min. Posteriormente se desechó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 500 µl de Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) utilizando el vortex. Después se le adicionó 9.6 ml de solución lítica (para 100 ml de solución: 5 ml de Tris-HCl 1M (pH 8.0), 4 ml de EDTA 0.5 M, 5 ml de SDS al 20%, 5.5 ml de NaOH 2N y 80.5 ml de agua destilada) y el tubo se mantuvo en agitación suave durante 25 min a 34 °C. Después se le agregó 990 µl de Tris-HCl 2M (pH 7.0) y se incubó en agitación suave durante 10 min. Se le agregó 2 ml de NaCl 5 M y se mantuvo en agitación suave durante 10 min,

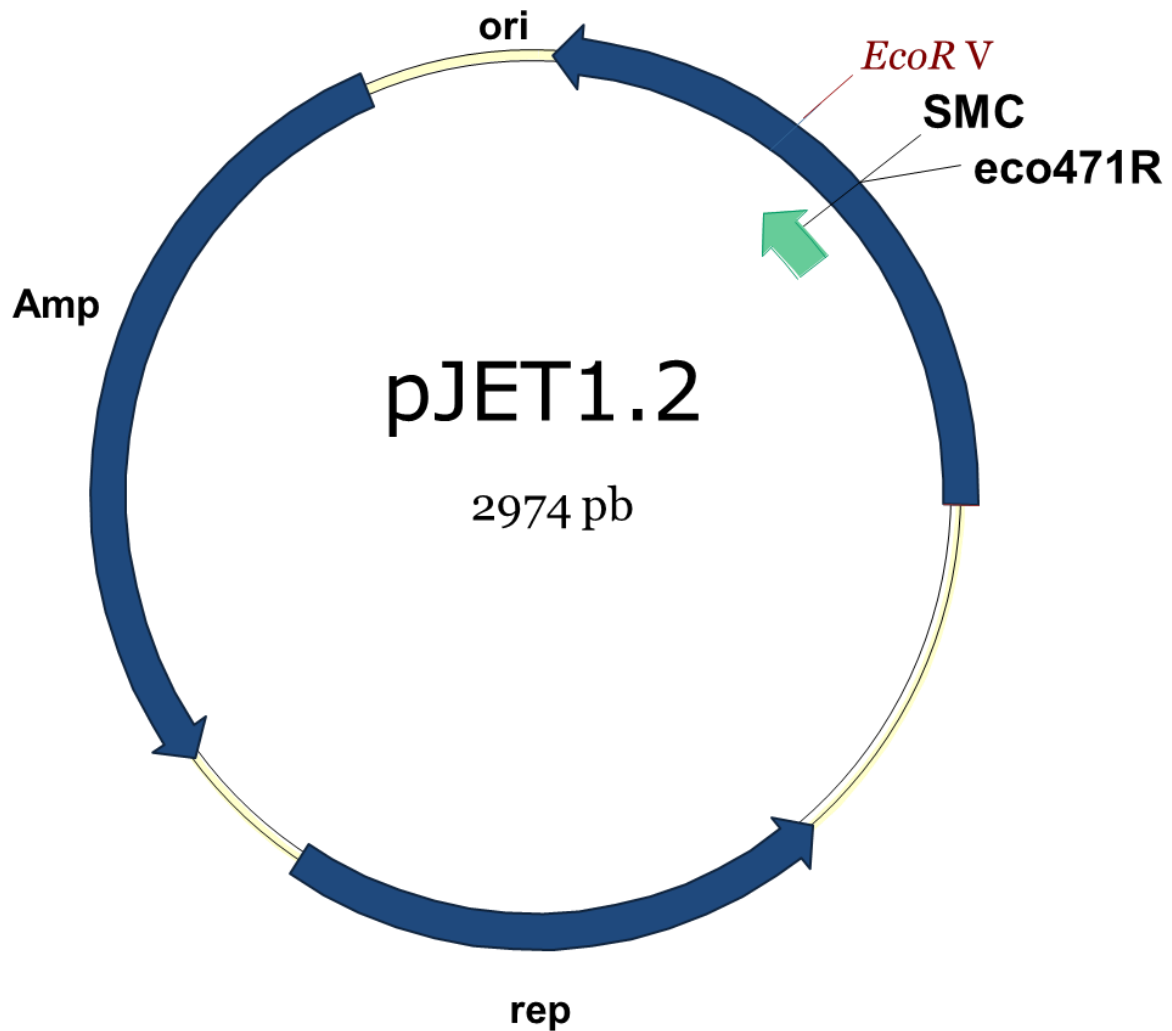


Figura 6. Vector pJET 1.2. El vector de clonación pJET 1.2/blunt tiene un tamaño de 2974 pb. Posee un origen de replicación para *E. coli* (ori); un gen de resistencia a ampicilina (Amp); un sitio de clonación múltiple (SMC) (Fermentas).

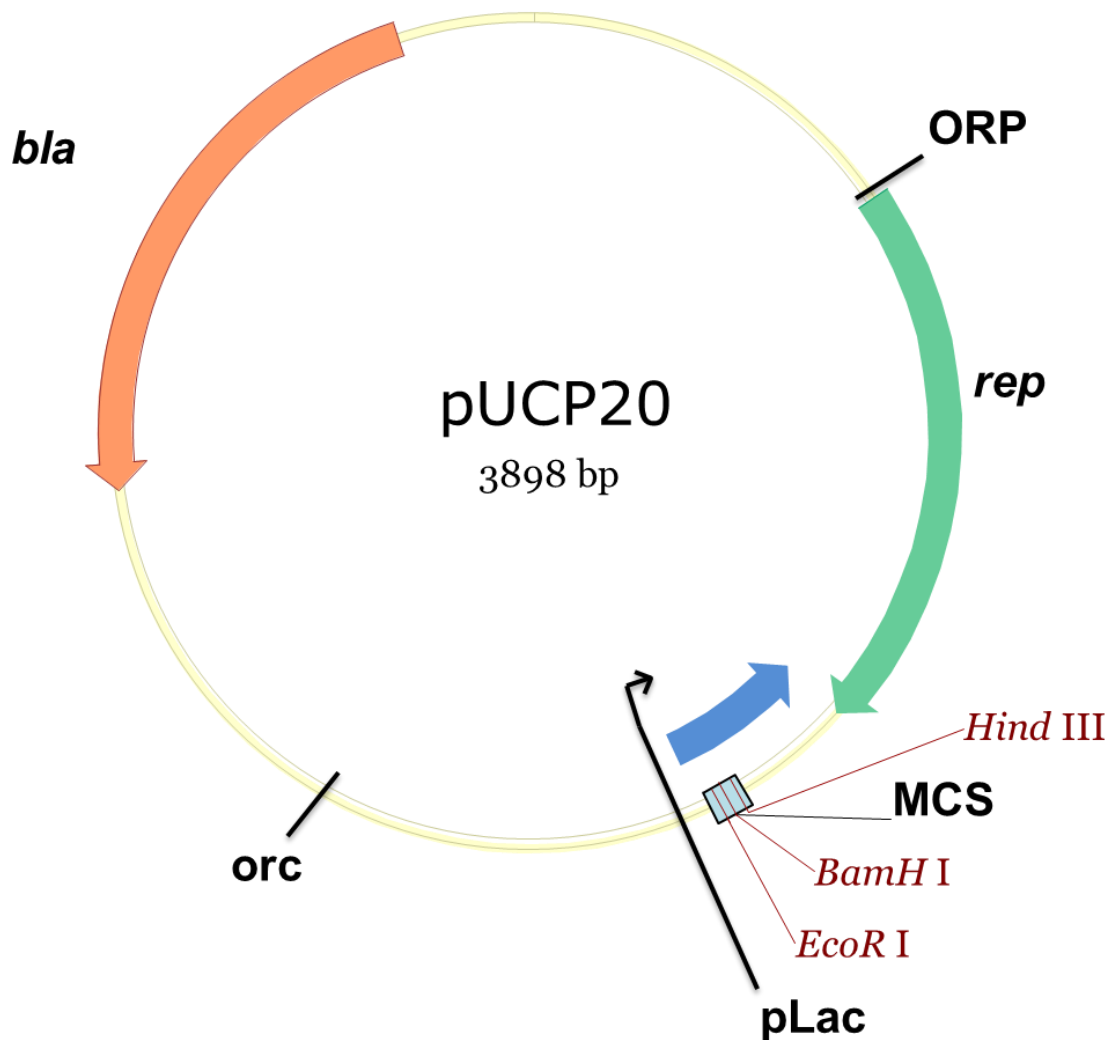


Figura 7. Vector de clonación pUCP20. El plásmido tiene un tamaño de 3898 pb, con el gen *bla* de resistencia a ampicilina y carbenicilina; orígenes de replicación para *E. coli* (*orc*) proveniente del plásmido pBR322 (*pBR322_origin*) y *P. aeruginosa* (*ORP*); un fragmento del gen *lacZ* que codifica a la β -galactosidasa; un promotor para el gen *lacZ* (*plac*); un sitio para clonación múltiple (*MCS*) con diferentes sitios de restricción (Modificado de West y col., 1994).

amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.5 mM), se mezcló y se centrifugó a 12000 rpm, a 4 °C durante 15 min. Se obtuvo el sobrenadante y se pasó a otro tubo, posteriormente se incubó en hielo 1 hora. Después se recuperó el sobrenadante por decantación en otro tubo y se le agregó 1 volumen de fenol saturado con tubo, se le adicionó 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 12000 rpm, a 4 °C durante 15 min. Posteriormente se extrajo la fase acuosa y se pasó a otro tubo, se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló y se mantuvo a -20 °C durante toda la noche. Después se centrifugó a 12000 rpm, a 4 °C durante 30 min y se eliminó el etanol, se secó al vacío la pastilla obtenida y se resuspendió en 100 µl de amortiguador TE. La muestra se guardó a -20 °C.

7.5. Extracción de DNA plasmídico por el método de columna

Se seleccionó una colonia aislada de *P. aeruginosa* (pUM505) y se inoculó en 4 ml de CL, el cual se incubó por 8 h a 37 °C con agitación de 300 rpm. Se realizó una dilución del cultivo de 1/500 en CL y se creció a 37 °C de 12-16 h con agitación vigorosa de 300 rpm. Después se centrifugó el cultivo a 9000 rpm por 15 min a 4 °C. Se procedió a realizar el aislamiento empleando el kit por columna de Qiagen. Para el aislamiento se realizó lo siguiente, el paquete celular se resuspendió en 10 ml del Buffer P1. Posteriormente se le agregó 10 ml del Buffer P2, se mezcló gentilmente por medio de 6 inversiones y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Después se le agregó 10 ml del Buffer P3, se mezcló inmediata y gentilmente por medio de 6 inversiones y se incubó en hielo por 20

min. Se volvió a centrifugar a 13000 rpm por 30 min a 4 °C, una vez centrifugada la muestra, se removió el sobrenadante a otro tubo, se volvió a centrifugar el sobrenadante a 13000 rpm por 15 min a 4 °C, y se transfirió el sobrenadante a otro tubo, repitiendo este proceso una vez más. Después se equilibró la columna con 10 ml de Buffer QBT, dejando que este fluyera por gravedad, posteriormente se aplicó el sobrenadante obtenido y una vez que este fluyó por toda la columna, se dieron dos lavados con 30 ml de Buffer QC, finalmente se eluyó el DNA con 15 ml de Buffer QF. Al eluido se le adicionó 10.5 ml (0.7 volúmenes) de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló y centrifugó a 13000 rpm por 30 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla de DNA con 5 ml de etanol al 70% centrifugando a 13000 rpm por 10 min a 4 °C, y se volvió a decantar el sobrenadante. Finalmente se secó la pastilla al vacío y se resuspendió el DNA con 100 µl de amortiguador TE. La muestra se guardó a - 20 °C.

7.6. Tratamientos enzimáticos de DNA

- Tratamiento con enzimas de restricción

El DNA se digirió utilizando una unidad de enzima de restricción (endonucleasas) por cada µg de DNA e incubando a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente se detuvo la actividad de las endonucleasas incubando durante 15 min a 65 °C.

- Ligación

Los fragmentos de DNA se ligaron al vector pUCP20 linearizado con enzimas de restricción, en una proporción 3:1 (inserto:vector) utilizando una unidad de la enzima T4 DNA ligasa (Promega). Esta reacción se llevó a cabo a 4 °C durante toda la noche. En el caso de la ligación de los fragmentos de PCR en el vector

pJET 1.2, se utilizó 10 µl del buffer de reacción, 1-2 µl del producto del PCR, 1 µl de la enzima blunting y 5 µl de agua ultra pura estéril, esta mezcla se incubó a 70 °C durante 5 min y se enfrió en hielo. Posteriormente se le adicionó 1 µl del vector pJET 1.2 (50 ng/ µl) y 1 µl de la enzima T4 DNA ligasa, la mezcla se incubó 30 min a 22 °C y se llevó a un volumen de 200 µl con agua ultra pura estéril, se le adicionó 200 µl de Fenol y 200 µl de cloroformo. Se agitó y se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm recuperando la fase superior y agregando 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M, así como 1 ml de etanol absoluto, se mezcló y se incubó 30 min a - 80 °C y se centrifugó de nuevo 15 min a 13000 rpm, la pastilla se lavó con 300 µl de etanol al 70% y se resuspendió en 10 µl de agua, finalmente se guardó a -20 °C.

7.7. Preparación de células electrocompetentes

De un cultivo de *E. coli* Top10 se inoculó un tubo con 4 ml de CL, y se incubó durante la noche a 37 °C, posteriormente inoculando en 250 ml de CL en un matraz de 1 l, se incubó durante 3 h a 37 °C con agitación constante hasta obtener una densidad óptica de 0.6 a 590 nm. Posteriormente se mantuvo el cultivo en hielo durante 20 min y se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min a 4 °C. Después la pastilla se resuspendió (vortex) en agua fría desionizada estéril (20 ml), se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min a 4 °C, se resuspendió en agua fría desionizada estéril con 10% de glicerol (20 ml) y se centrifugó como en el paso anterior. Finalmente se resuspendió la pastilla con 2 ml de agua fría desionizada estéril con 10% de glicerol, distribuyendo en alícuotas de 200 µl en tubos de 0.5 ml. Se almacenaron a - 80 °C.

7.8. Transformación por electroporación

En un tubo Eppendorf se mezclaron 100 µl de células electrocompetentes con 1 µl de DNA plasmídico. Después se colocó la mezcla entre los electrodos de una celda de electroporación fría. Se activó el micropulso a 1800 V, la mezcla se transfirió a un tubo con 2 ml de CL. Se incubó a 37 °C por 1 h con agitación constante. Se plaqueó 100 µl del cultivo y el cultivo restante (1.9 ml) se concentró centrifugando 2 min a 13000 rpm, y se resuspendió en 100 µl para plaquear en AL con Ampicilina (100 µg/ml) + X-Gal (40 mg/ml) e IPTG (0.4 mM) para la selección de las transformantes.

7.9. Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina

Se inoculó un tubo con 4 ml de CL con las cepas de interés, el cual se incubó toda la noche a 37 °C con agitación de 300 rpm, posteriormente se centrifugó el cultivo durante 2 min a 12000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 100 µl de STE (Sacarosa 50 mM, Tris 25 mM, EDTA 10 mM a pH 8), después se le agregó 20 µl de lisozima 20 mg/ml, se mezcló suavemente y se incubó 5 min a 37 °C, posteriormente se le agregó 250 µl de solución lítica (50 µl de NaOH 2 N, 100 µl de SDS 10% y 850 µl de agua), se incubó en hielo durante 5 min. Después se le adicionó 300 µl de una solución de acetato de potasio 3M a pH de 4.8. Se mezcló y se incubó en hielo durante 10 min. Posteriormente se centrifugó a 12000 durante 10 min y se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se le agregó 500 µl de una mezcla fenol-cloroformo (24:24), se mezcló y se centrifugó a 12000 durante 10 min. Después se transfirió la fase superior a otro tubo y se le adicionó 1 ml de etanol absoluto, se mezcló y se incubó 20 min a – 80 °C, se

centrifugó a 12000 durante 10 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó 2 veces con 1 ml de etanol al 70%, centrifugando a 12000 durante 10 min por lavado. Se secó la pastilla al vacío y se resuspendió en 50 µl de agua HPLC, adicionando 5 µl de RNAsa (10mg/ml) y se incubó a 37 °C durante 30 min, posteriormente se inactivó la RNAsa incubando a 65 °C durante 15 min y la muestra se analizó en un gel de agarosa 1%.

7.10. Electroforesis en gel de agarosa

El análisis y separación del DNA plasmídico y cromosómico se realizó en geles de agarosa al 0.7%, 1% o 1.5% (p/v) dependiendo el tamaño del DNA, en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M pH 8 y EDTA 0.001 M pH 8). El gel se colocó en una cámara de electroforesis horizontal con el amortiguador. Las muestras de DNA se mezclaron con el amortiguador de carga (Azul de bromofenol 0.05%, EDTA 0.1 M pH 8, SDS 0.5% y sacarosa 40%). El corrimiento electroforético se realizó a un voltaje constante de 150 voltios durante 40-60 min. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01% durante 5 min y los fragmentos de DNA teñidos se observaron por medio de un transluminador de luz ultravioleta de onda corta (Ultra-Violet Products Inc.). Como marcador de tamaño molecular de DNA se utilizó el DNA fago lambda digerido con endonucleasa *Hind III* y el marcador de escalera de 1 Kb plus (Invitrogen).

7.11. Amplificación por PCR

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo con el kit Master Mix de Promega. Para amplificar cada fragmento se utilizó el DNA total del

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

NOMBRE (<i>orf</i>)	OLIGONUCLEOTIDO
DIR ORF1	5'- AAG TCA GTT CCT GGT GGA AAG CTT C -3'
REV ORF1	5'- TCG TTT GGT CTC GAA TTC AGA GCT G -3'
DIR ORF16	5'- CAG TCC TAA ACG GT AAGC TTT GGC G -3'
REV ORF16	5'- AAG AGT GGT GGAATT CTA AGT CGG C -3'
DIR ORF42	5'- AGG AAG CTT ACG ATC CGT ATC GCG G-3'
REV ORF42	5'- ACG ACC ACG AAT TCC TCA ACC CTC T-3'
DIR ORF 70	5'- GCT GCC AAT GAT GGC GAT ATG-3'
REV ORF 70	5'- TGA CCG AAA TCA CCG TGA ATG G-3'
DIR ORF´s 110-111	5'- TTT CAG ATC AAG CTT ACT GGG GGAG -3'
REV ORF´s 110-111	5'- AAG GCG ACA CCG AAT TCC AAA ACA C -3'

Rojo- sitio de corte para *Hind* III

Azul- sitio de corte para *EcoR* I

Se muestra el nombre de los oligonucleotido, junto con el orf que se amplifica.

cual se empleó 1 µg/µl y se adicionó 10 pmol del oligonucleótido sentido y 10 pmol del anti sentido, 13.5 µl de agua y por último 15 µl de la mezcla de enzima Taq DNA polimerasa, dNTP's y MgCl₂ (Master Mix) para llevar a un volumen total de 30 µl. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Tabla 1**.

Para los *orfs* 1, 16, 42 y 110-111, se utilizaron las siguientes condiciones de la reacción: 94 °C, 5 min, seguido de 35 ciclos (94 °C, 30 seg; 55 °C, 2 min; 68 °C, 1 min) y una extensión final de 68 °C, 5 min. Para el *orf* 70, se utilizaron las siguientes condiciones de la reacción: 94 °C, 5 min, seguido de 35 ciclos (94 °C, 30 seg; 60 °C, 30 seg; 72 °C, 1 min) y una extensión final de 72 °C, 10 min.

7.12. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa

Para la purificación de fragmentos de DNA se empleó el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, en donde se paró el DNA en un gel de agarosa al 1% por electroforesis, posteriormente se tiñó con bromuro de etidio al 0.01%. El fragmento de interés se cortó y pasó a un tubo para centrifugar, adicionando 1 µl de solución de unión a membrana por cada µg de gel y se disolvió a 65 °C, posteriormente el gel disuelto se transfirió a una micro columna y se incubó 1 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 1 min a 6000 rpm y se desechó el líquido, posteriormente la columna se lavó dos veces con solución de lavado, después se incubó a 65 °C y se le agregó 50 µl de agua ultra pura estéril centrifugando durante 1 min a 6000 rpm y se recuperó el DNA purificado en un tubo limpio y estéril.

7.13. Ensayos de virulencia en hojas de lechuga

Se crecieron preinóculos de las cepas de interés en CL a 37 °C toda la noche, posteriormente se realizó una dilución 1:200 de los cultivos en matraces con 25 ml de CL y se incubó a 37 °C con agitación hasta fase logarítmica (DO_{600} de 0.6). Los cultivos se diluyeron en $MgSO_4$ 10 mM (1:3). Adicionalmente se desinfectaron hojas de lechuga durante 30 min con una solución de cloro al 0.1%, las cuales se enjuagaron con agua destilada y después con agua estéril. Las hojas se colocaron en un recipiente (desinfectado previamente con la solución de cloro 0.1%) que contiene una base de papel Whatman impregnado con $MgSO_4$, y se inocularon con 10 μ l de la dilución anterior del cultivo en la nervadura de la hoja. Se cubrieron los recipientes con película autoadherible y se incubaron a 30 °C durante 4 días. Se revisó diariamente la necrosis producida en la hoja de lechuga. Al cuarto día se calculó el área de daño o necrosis mediante la fórmula $A = \pi (0.25) (L) (W)$, donde A: Área, L: largo y W: ancho. Posteriormente se cortó la región dañada, se colocó en un mortero estéril, se trituró el tejido y se maceró por 2 h en 15 ml de $MgSO_4$ (10 mM) se realizó una dilución con solución de $MgSO_4$ a 10^{-5} para *P. aeruginosa* y 10^{-2} para *E. coli* y se inoculó 100 μ l de las diluciones en AL incubando durante 18 h a 37 °C para realizar el conteo de UFC.

7.14. Cinéticas de crecimiento

Se crecieron preinóculos de las cepas de interés en 20 ml de CL o medio mínimo M9 a 37 °C con agitación constante durante toda la noche, posteriormente se determinó la DO_{600} del cultivo y se hizo una dilución para obtener 20 ml del cultivo con CL o medio M9 estéril hasta una DO_{600} de 0.1, los cultivos diluidos se

incubaron a 37 °C con agitación constante, midiendo la absorbencia del cultivo cada hora, durante 8 h.

7.15. Transferencia del plásmido pUM505 por conjugación

Se crecieron la cepa donadora (D) y la cepa receptora (R) en tubos con 4 ml de CL a 37°C durante 24 h con agitación constante, posteriormente se realizaron diluciones 1:50 en CL y se incubó a la D a 37 °C y a la R a 42 °C hasta un crecimiento con DO₆₀₀ de 0.5, después se mezclaron la cepa D y la R en proporción de 1:1, 1:10, 10:1 y se incubaron a 37°C durante 24 h sin agitación. Una vez crecidas, se realizaron diluciones 1:10 y 1:100 de la mezcla y se plaquearon 100 µl de cada dilución en cajas con medio selectivo; posteriormente se incubaron por 18 h a 37 °C, para cuantificar las colonias transconjugantes.

7.16. Pruebas de susceptibilidad

Para realizar las pruebas de susceptibilidad se crecieron los preinóculos en CN de las diferentes cepas de *P. aeruginosa* a 37°C durante 24 h; posteriormente se realizó la medición de la DO por espectrofotometría a 600 nm, se ajustaron los cultivos a DO₆₀₀ de 0.1 y se inocularon tubos de caldo nutritivo con concentraciones de 0, 0.25, 0.5 y 0.75 mM de K₂Cr₂O₇; después se incubaron a 37°C durante 18 h, por último, se midió la DO₆₀₀ y se graficaron los valores.

7.17. Análisis *in silico*

Los probables operones se identificaron con el programa computacional <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>. Para el diseño de los oligonucleótidos se empleó el software “Oligo Analyzer 3.1” en el sitio <http://www.idtdna.com/calc/analyser>. Las enzimas de restricción

empleadas para la construcción del banco de genes se seleccionaron con base en el patrón de restricción, utilizando en programa computacional “Enzyme Finder” en el sitio <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>. Los análisis de BLAST de las proteínas identificadas se realizaron utilizando el programa computacional http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome, que analiza similitud de secuencias.

RESULTADOS

8.1. Participación del plásmido pUM505 en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*

Para determinar si el plásmido pUM505 incrementa la virulencia de la cepa PAO1, se realizaron ensayos de virulencia en hojas de lechuga, utilizando a la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505), *P. aeruginosa* PA14 como control positivo de virulencia y *E. coli* Top10 como cepa no patógena. Los resultados mostraron que las hojas donde se inoculó *E. coli* sólo mostraron la lesión donde se realizó el inóculo y que *P. aeruginosa* PA14 mostró el área mayor de lesión. Cuando se inoculó a *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505), ésta produjo una lesión mayor que la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 sin el plásmido (**Figura 8A**). El área de lesión se graficó y se pudo observar que hay una diferencia significativa entre las cepas mencionadas (**Figura 8B**). Posteriormente se determinó la cantidad de UFC de las lesiones, como se describe en materiales y métodos. Se encontró que la cepa con el plásmido pUM505 presentó cuatro veces más UFC que la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 que no contenía al plásmido. El inóculo con la cepa PA14, generó el mayor número de UFC y se obtuvieron muy pocas UFC de la lesión con *E. coli* (**Figuras 8C y D**). Para la determinación de las UFC, se normalizó el efecto de *P. aeruginosa* PAO1 a 1.0 para disminuir la variación que se produce entre los ensayos.

8.2. Identificación de los genes de pUM505 involucrados en la virulencia

Una vez que se determinó que el plásmido pUM505 confiere virulencia a la cepa

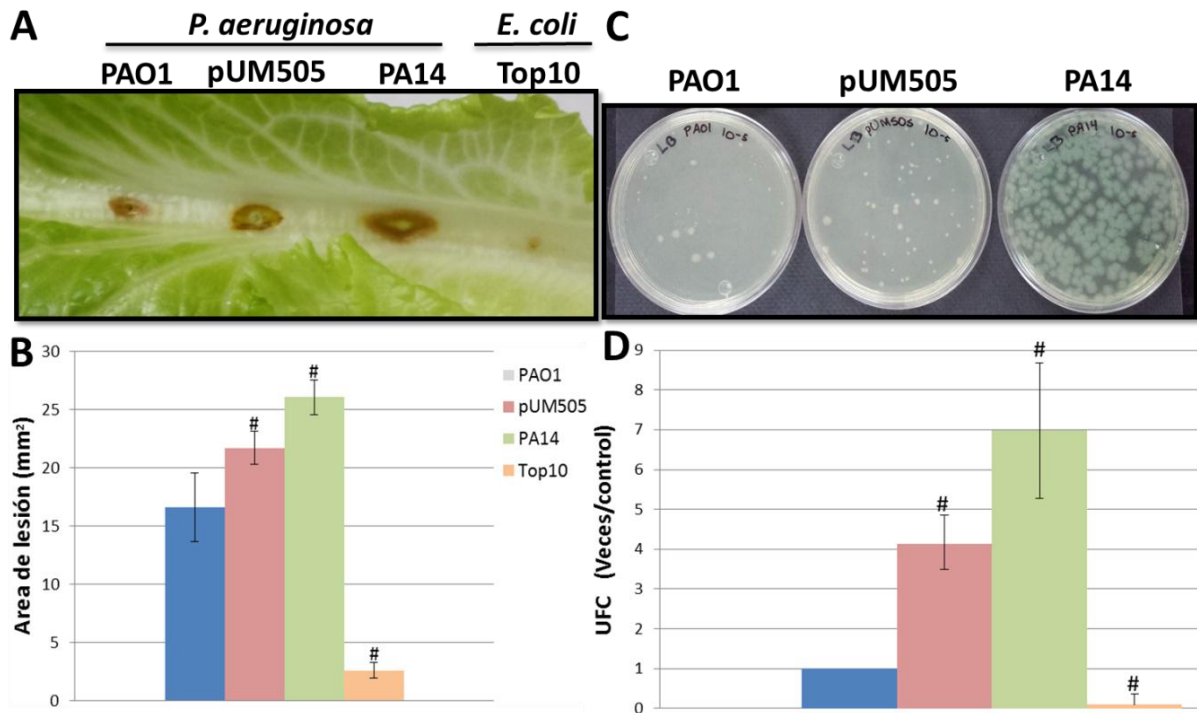


Figura 8. Participación de pUM505 en la virulencia de *P. aeruginosa* en hojas de lechuga. A) Fotografía de las áreas de lesión generadas por las diferentes cepas sobre la nervadura de las hojas de lechuga. B) Gráfica del área de lesión generada por las diferentes cepas en la hoja de lechuga. C) Fotografías representativas de las cajas con las unidades formadoras de colonias (UFC) obtenidas de cada una de las lesiones. D) Gráfica de las UFC (veces/control) obtenidas de cada una de las áreas de lesión. Con un numeral (#) se señalan las cepas con diferencia significativa estadísticamente respecto al control. Datos de 4 experimentos independientes.

de *P. aeruginosa* PAO1 en el modelo de lechuga, se realizó la identificación de los genes involucrados en la misma. Se optó por hacer una biblioteca de genes del plásmido pUM505 en el vector de clonación de alto número de copias pUCP20. La biblioteca de genes se obtuvo como se describe en materiales y métodos, utilizando la estrategia mostrada en la **Figura 9**. Se realizó el análisis *in silico* del patrón teórico total de restricción de pUM505 empleando las enzimas de restricción *HindIII/EcoRI* y *HindIII/BamHI*. La restricción teórica de *HindIII/EcoRI* mostró un patrón de 24 fragmentos y *HindIII/BamHI* uno de 17 fragmentos, los cuales predicen tamaños de entre 0.5 a 5.6 kb con el primer par de enzimas y de 0.8 a 5.3 kb con el segundo par, por lo que la biblioteca de genes de pUM505 se realizó empleando estos dos pares de enzimas.

Se obtuvieron un total de 60 clonas utilizando los productos de la digestión con las enzimas de restricción *EcoRI/HindIII* y otras 60 clonas utilizando los productos de la digestión con las enzimas *BamHI/HindIII*. De las 120 clonas obtenidas de la biblioteca de genes, se tomaron 45 y se les realizó una caracterización de los plásmidos recombinantes por patrón de restricción (**Figura 10**). Se tomó una muestra de 45 de los 120 plásmidos recombinantes y éstos mostraron tamaños de insertos variados, de entre 1 a 7 kb, en donde la mayoría poseen insertos de entre 2 y 4 kb (**Figura 11**).

Las 120 clonas obtenidas de la biblioteca se utilizaron en ensayos de virulencia. 15 de éstas incrementaron en al menos el doble las UFC obtenidas respecto al inóculo control *E. coli* Top10 (sin plásmidos recombinantes) (**Figura 12**). Para descartar la posibilidad de que el plásmido pUCP20 estuviera proporcionando la capacidad de incrementar la virulencia, se realizó un ensayo con *E. coli* Top10 y

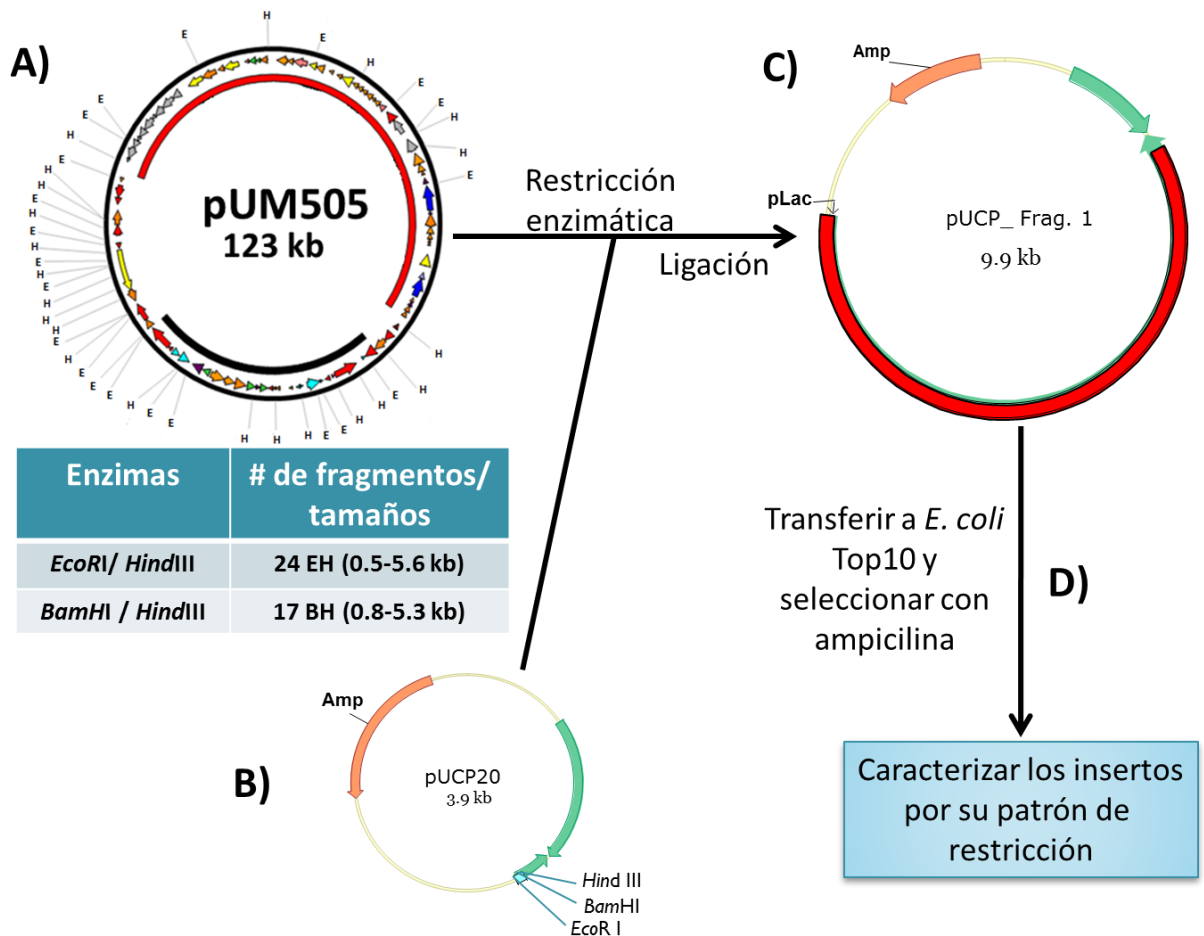


Figura 9. Estrategia experimental para obtención de la biblioteca de genes de pUM505. A) Extracción de pUM505 y digestión totalmente con enzimas de restricción: (1) *EcoRI/HindIII*; (2) *BamHI/HindIII*. B) Digestión del vector pUCP20 con las mismas enzimas. C) Ligación los fragmentos de pUM505 con pUCP20 digerido, para obtener los plásmidos recombinantes. D) Transferencia de los plásmidos recombinantes a células de *E. coli* (Top10), seleccionando con ampicilina.

E. coli Top10 (pUCP20), en donde no se observaron diferencias significativas (datos no mostrados).

De las 15 clonas seleccionadas por incrementar la virulencia de *E. coli* Top10, la clona EH 26 mostró un incremento de las UFC de cuatro veces respecto al control, mientras que las 14 clonas restantes mostraron un incremento de 2 o más veces. Una vez que se identificaron las clonas que incrementaron la virulencia de *E. coli* Top10, los plásmidos recombinantes se aislaron y se transfirieron a *P. aeruginosa* PAO1. Posteriormente se realizaron los ensayos de virulencia utilizando hojas de lechuga. Los ensayos mostraron que la cepa con pUM505 muestra una diferencia significativa en el grado de virulencia respecto al control al incrementar 3.9 veces las UFC recuperadas. De igual manera, se realizó el conteo de las UFC, observando que de las 15 clonas de *P. aeruginosa*, EH 28, EH 26, EH 24 y EH 8 incrementaron en dos o más veces las UFC con respecto al control (**Figura 13**).

Derivado de los ensayos de virulencia se determinó que cuatro clonas incrementaron la virulencia tanto en *E. coli* Top10, como en *P. aeruginosa* PAO1. Para descartar la posibilidad de que el incremento por las clonas en la virulencia se debiera a que está alterada la velocidad de crecimiento, se realizaron cinéticas de crecimiento en CL. Se observó que *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505), así como las clonas EH 28, EH 26, EH 24 y EH 8 no mostraron una diferencia significativa en la velocidad de crecimiento con respecto a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 14**). Además, utilizando medio M9, se realizaron cinéticas de crecimiento de la transformante en *P. aeruginosa* (EH 28) y *P. aeruginosa* PAO1 observándose velocidades de crecimiento similares (datos no mostrados), por lo que se puede descartar la posibilidad de que el fenotipo sea debido a un

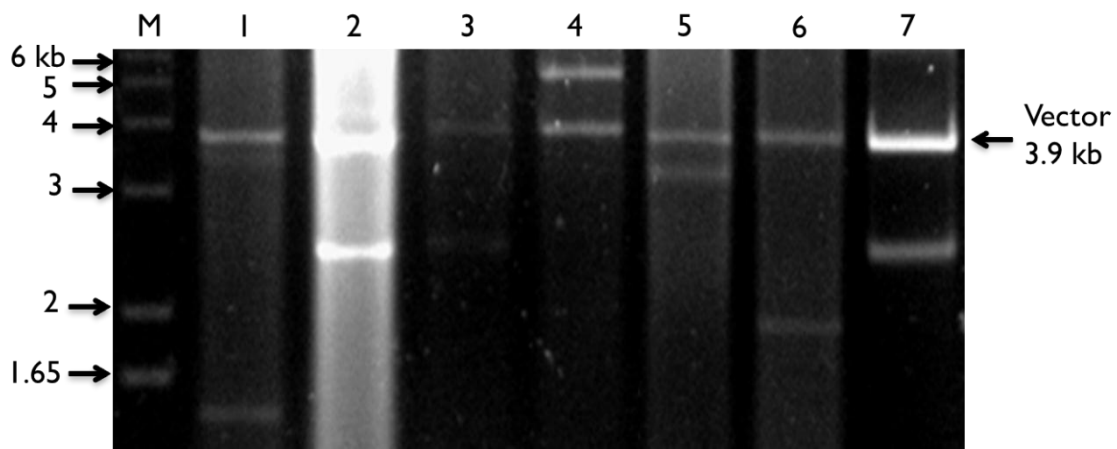


Figura 10. Análisis de restricción de los plásmidos recombinantes de la biblioteca de genes de pUM505. Gel de agarosa al 1%. M, marcador de tamaño molecular 1 kb plus. En los carriles del 1 al 7 se muestran los fragmentos de la restricción de los plásmidos de algunas clonas de la biblioteca de genes. El fragmento de 3.9 kb corresponde al vector pUCP20.

incremento en la velocidad de crecimiento. Los fragmentos insertados en los plásmidos recombinantes de siete de las clonas virulentas mostraron tamaños entre 1.7 a 5.6 kb y se enviaron para ser secuenciados. Las clonas EH 8, EH 24, EH 40, BH 10 y BH 19 tienen clonado un fragmento perteneciente a la isla de patogenicidad de pUM505 y EH 26 y EH 28 contienen un fragmento localizado

fuera de la isla de patogenicidad. La localización de dichos fragmentos se muestra en el mapa genético de la **Figura 15**.

El análisis *in silico* de las secuencias mostró que la clona EH 24 tiene cinco genes, los *orfs* 138, 1, 2, 3, 4, de los cuales sólo el *orf* 2 codifica una PH que tiene homología con un gen previamente descrito en virulencia. Además, se encontró que los *orfs* 138 y 1, codifican a PHs, el *orf* 3 codifica un probable regulador transcripcional y el *orf* 4 codifica una proteína de unión a DNA. Las clonas BH 10 y BH 19 tienen el mismo fragmento clonado, en donde se encontraron los *orfs* 16 y 17 que codifican PHs; sin embargo, el *orf* 17 tiene homología con un gen previamente descritos en virulencia. La clona EH 40 posee el *orf* 26, que codifica una proteína de membrana, homóloga con una proteína que se ha asociado a la virulencia. La clona EH 26 contiene los *orfs* 92, 93 y 94 los cuales codifican un regulador transcripcional, una resolvasa y una transposasa, respectivamente, en donde el producto del *orf* 94 tiene un homólogo que ya ha sido involucrado en virulencia. La clona EH 28 contiene clonado al *orf* 97, el cual codifica una PH y la clona EH 8 contiene a los *orfs* 110, 111 y 112; el *orf* 110 codifica una PH, el *orf* 111 una permeasa previamente reportada en virulencia y el *orf* 112 codifica otra PH (**Tabla 2**). La tabla 2 resume los genes de pUM505 clonados en pUCP20 que mostraron un incremento de la virulencia en *E. coli* y *P. aeruginosa*.

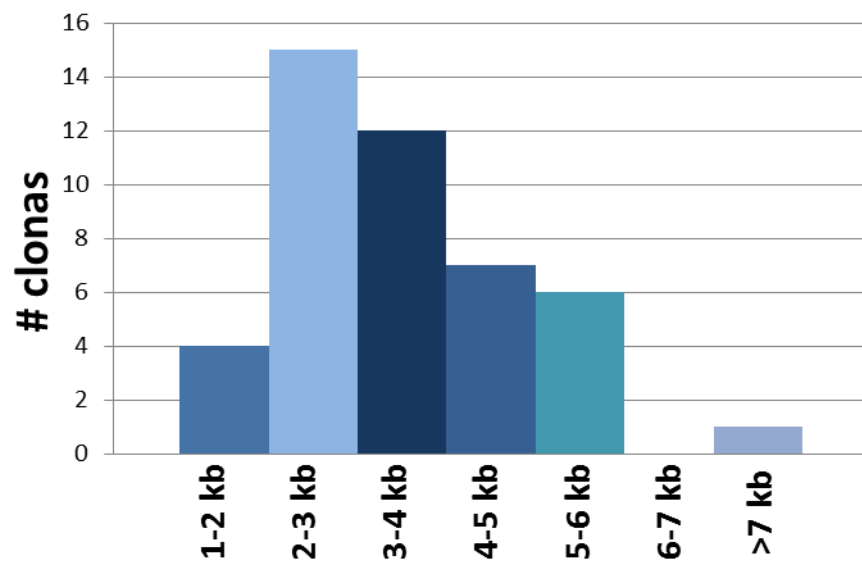


Figura 11. Distribución del tamaño de los fragmentos clonados. Se grafica la frecuencia del tamaño de los fragmentos de pUM505 clonados de una muestra de 45 plásmidos recombinantes analizados.

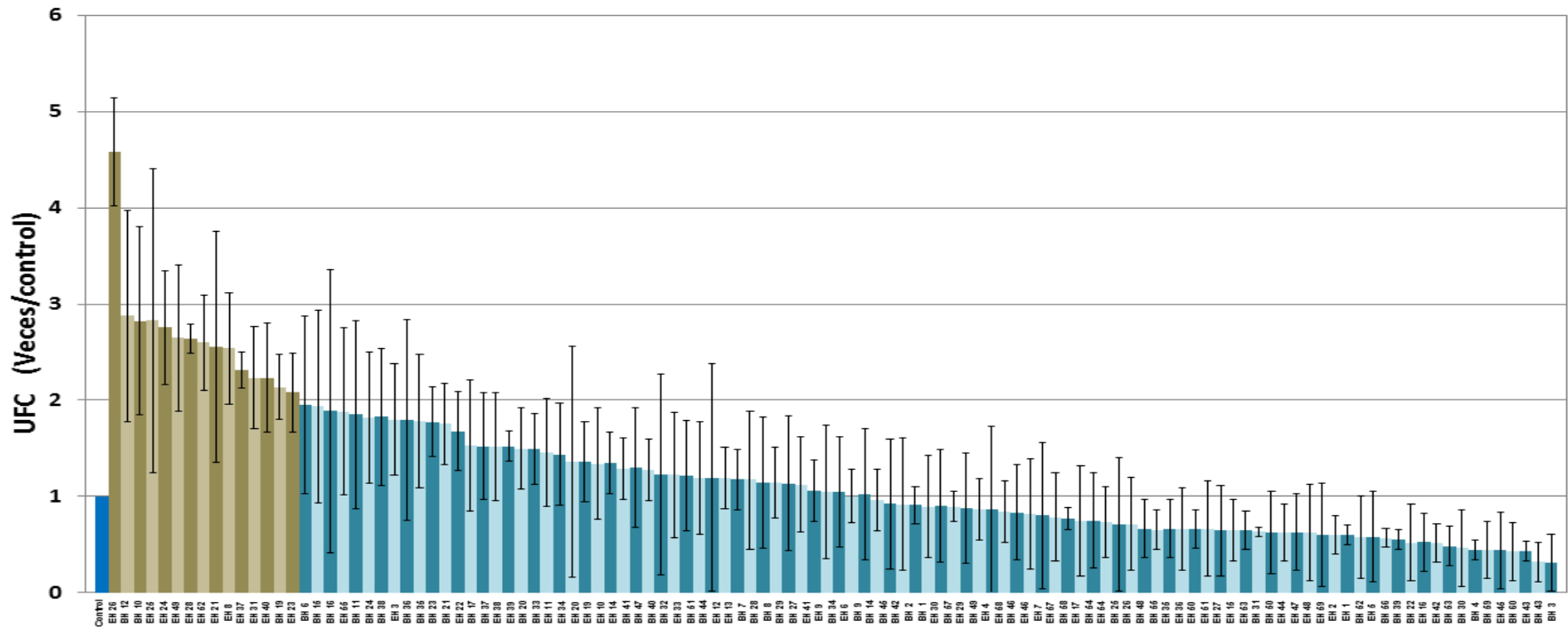


Figura 12. Virulencia de las transformantes de *E. coli* Top10 con la biblioteca de genes de pUM505. Gráfica de las UFC, utilizando el modelo de hoja de lechuga. Se muestran los valores de las UFC (veces/control). La barra azul de la izquierda muestra el control (*E. coli* Top10) estandarizado a 1.0. Se muestran las clonas organizadas de mayor a menor virulencia, las primeras quince clonas muestran una diferencia significativa respecto al control (color café). Las clonas que no mostraron diferencia significativa respecto al control (color azul). Datos de 2-4 experimentos independientes.

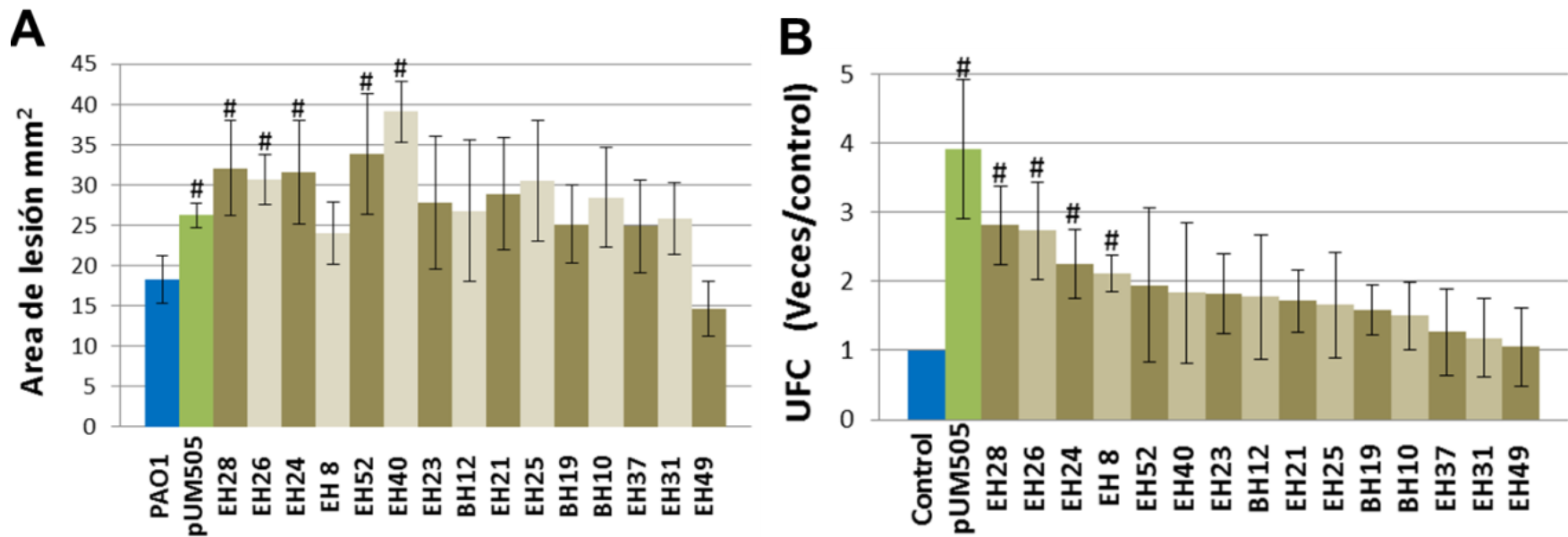


Figura 13. Análisis de la virulencia de las transformantes de *P. aeruginosa* con genes de la biblioteca de pUM505.

A) Gráfica del área de la lesión de las hojas de lechuga con las diferentes clonas de *P. aeruginosa*, así como con la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* (pUM505). B) Gráfica de las UFC obtenidas en los ensayos de infección de las 15 transformantes y de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* (pUM505). Con un numeral (#) se señalan las clonas con diferencia estadísticamente significativa respecto al control. Se muestran los datos de 3 experimentos independientes.

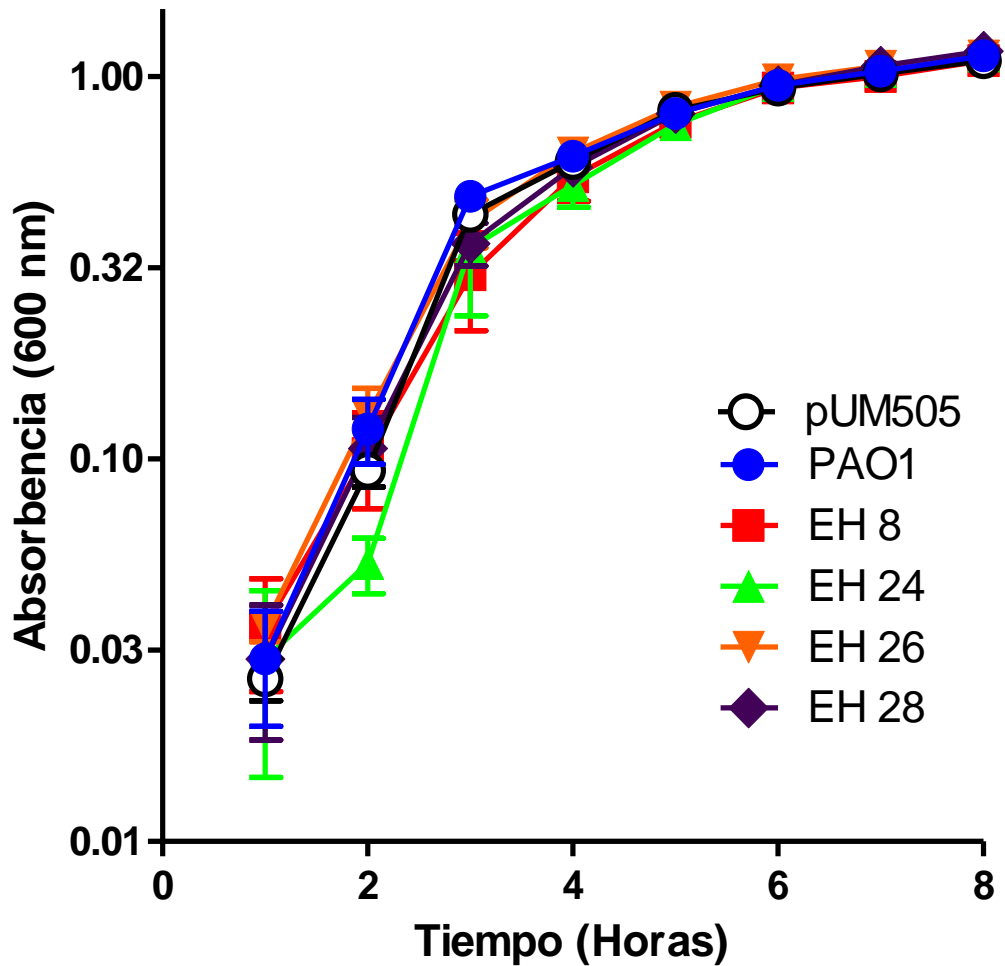


Figura 14. Cinéticas de crecimiento de las clonas de *P. aeruginosa*. Crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1, EH 8, EH 24, EH 26, EH 28 y *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505). Se muestra el crecimiento en medio LB a 37 °C durante los tiempos indicados. Datos de 3 experimentos independientes.

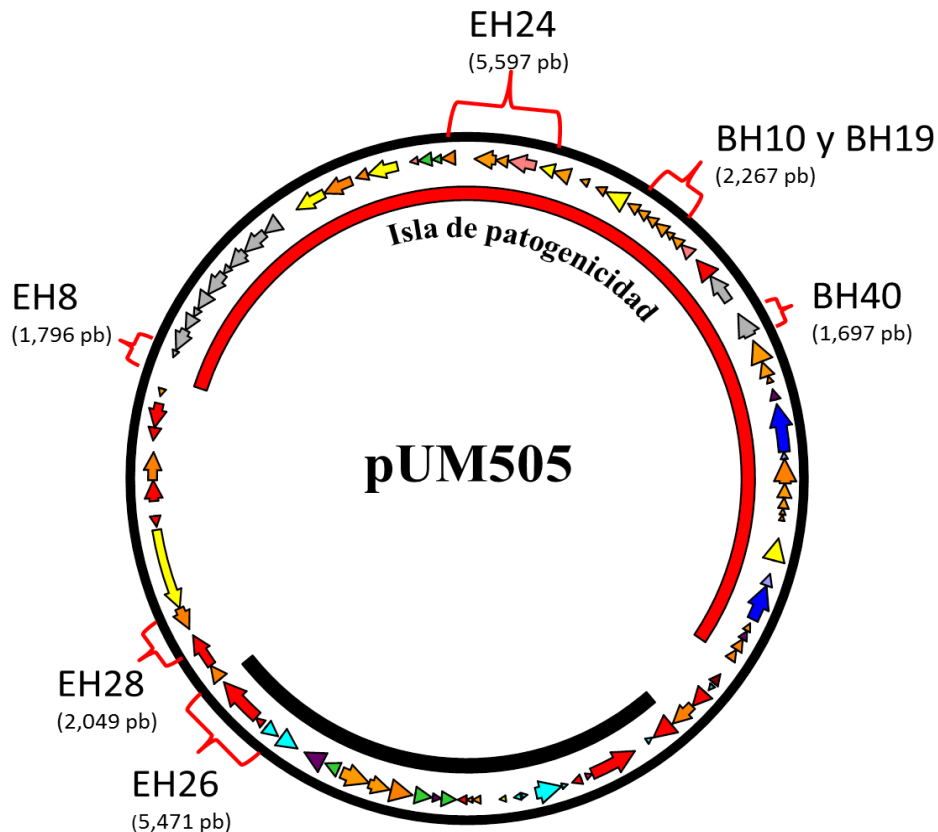


Figura 15. Mapa genético de pUM505 con la localización y tamaño de los insertos de las clonas que incrementan la virulencia. Los corchetes rojos señalan las regiones de los fragmentos de pUM505 clonados en los plásmidos recombinantes que incrementaron la virulencia. Se señala el nombre de la clona que contiene dicho fragmento clonado, así como el tamaño del inserto.

Tabla 2. *orfs* de pUM505 identificados en las clonas que incrementan la virulencia.

clona	orf de pUM505	Nombre del gen	Función	Cepa o especie
EH 24	138	-----	P.H.	<i>P. aeruginosa</i> PA14
EH 24	1	-----	P.H.	PA14
EH 24	2*	-----	P.H.	PA14
EH 24	3	<i>parB</i>	Regulador transcripcional	PA14
EH 24	4	-----	Proteína de unión a DNA	PA14
BH 10 y 19	16	-----	P.H.	PA14
BH 10 y 19	17*	-----	P.H.	PA14
BH 40	26*	<i>traG</i>	Proteína de membrana	PA14
EH 26	92	<i>chrB</i>	Regulador transcripcional	<i>Cupriavidus metallidurans</i>
EH 26	93	<i>tnpR</i>	Resolvasa	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
EH 26	94*	<i>tnpA</i>	Transposasa	<i>Helicobacter pylori</i>
EH 28	97	-----	P.H.	<i>Campylobacter jejuni</i>
EH 8	110	-----	P.H.	<i>P. aeruginosa</i> VRFPA03
EH 8	111*	-----	Permeasa	<i>Photobacterium damsela</i>
EH 8	112	-----	P.H.	PA14

P.H. = Proteína hipotética

* = Involucrados previamente en virulencia

8.3. Participación de los *orfs* 1, 16, 42 y 110-111 de pUM505 en la virulencia

Con el propósito de determinar si la virulencia se debe a uno o al conjunto de genes de las clonas seleccionadas, se eligieron algunos genes al azar para clonar individual o en conjunto. Los *orfs* 1, 16, 42 y 110-111 se amplificaron por PCR, usando los oligonucleótidos mostrados en la **Tabla 1**. El fragmento que contiene al *orf 1* tiene un tamaño de 1895 pb, el que contiene al *orf 16* de 1047 pb, el que contiene al *orf 42* de 831 pb y el de los *orfs 110-111* de 615 pb, se puede observar en el gel de electroforesis los amplificadores esperados (**Figura 16**). Los productos de PCR de los *orfs* 1, 16, 42 y 110-111 se transfirieron a *E. coli* Top10, utilizando la estrategia de clonación y subclonación mostrada en las **Figuras 17-20**, se realizaron las clonaciones en el vector pJET 1.2, posteriormente se realizaron las restricciones con las enzimas *HindIII* y *EcoRI* para verificar dichas clonaciones (geles de la izquierda de cada estrategia), esperando el tamaño de cada uno de los *orfs*, así como el del vector (2.9 kb). Además, se realizaron las subclonaciones de estos *orfs* en el vector pUCP20, verificando de igual manera los patrones de restricción con las enzimas *HindIII* y *EcoRI* (geles de la derecha de cada estrategia), esperando el tamaño de cada uno de los *orfs*, así como el del vector (3.9 kb).

Una vez que se subclonaron los *orfs* 1, 16, 42 y 110-111 en el vector pUCP20, se transfirieron a *P. aeruginosa* PAO1 y se seleccionaron con carbenicilina. Posteriormente se realizaron ensayos de virulencia con el modelo de hojas de lechuga en *E. coli* Top10 y en *P. aeruginosa* PAO1.

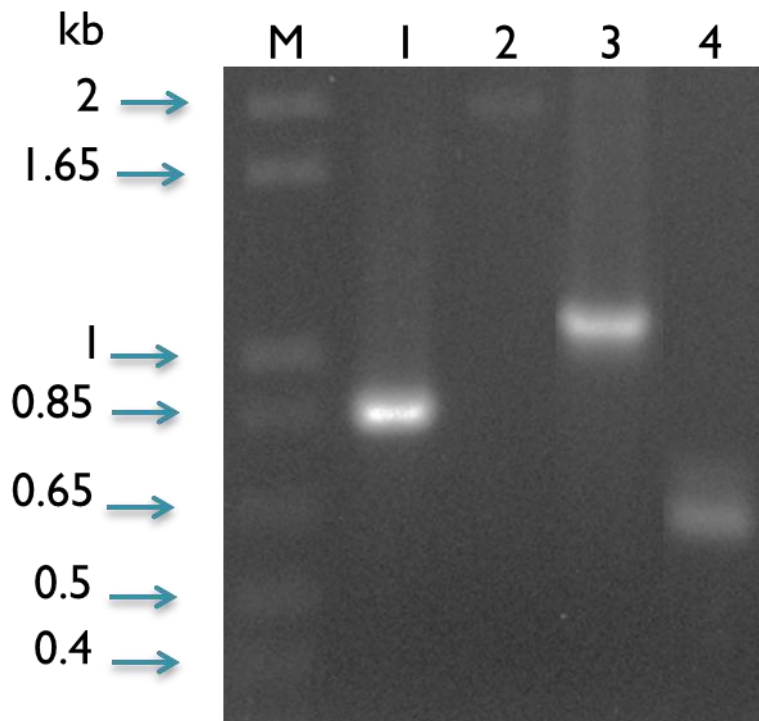


Figura 16. Producto del PCR de los *orfs* de pUM505. Gel de agarosa al 1%, en donde se muestra el marcador de 1 kb plus (M), en los carriles del 1 al 4 los amplificados por PCR de los *orfs* 42, 1, 16 y 110-111 respectivamente.

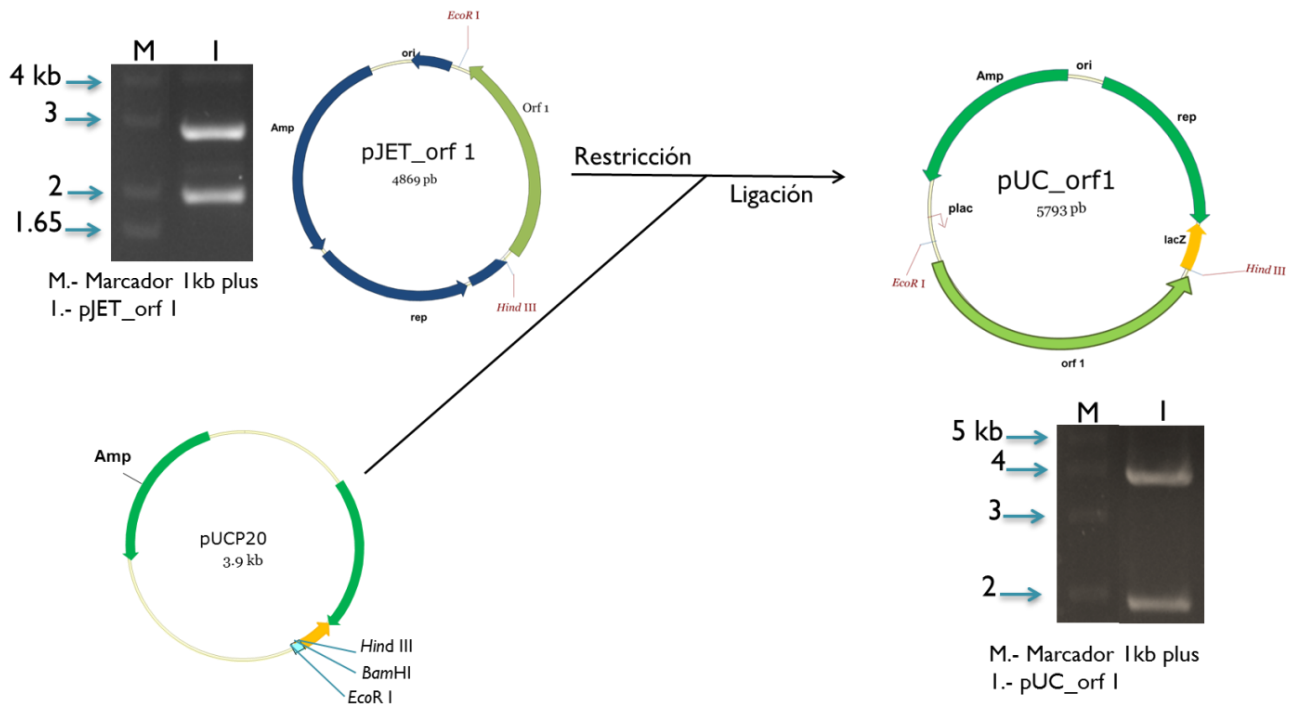


Figura 17. Estrategia de la clonación y subclonación del *orf 1*. El producto de PCR del *orf 1* se ligó con el vector pJET 1.2, se realizó una restricción enzimática con *Hind III* y *EcoR I* y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa (gel de la izquierda). Posteriormente el DNA correspondiente al *orf 1* se subclonó en el vector pUCP20, se extrajo el plásmido recombinante, se realizó otra restricción enzimática con *Hind III* y *EcoR I* y se corrió un gel de agarosa para caracterizar la subclonación (gel de la derecha). Marcador de 1 kb plus (M).

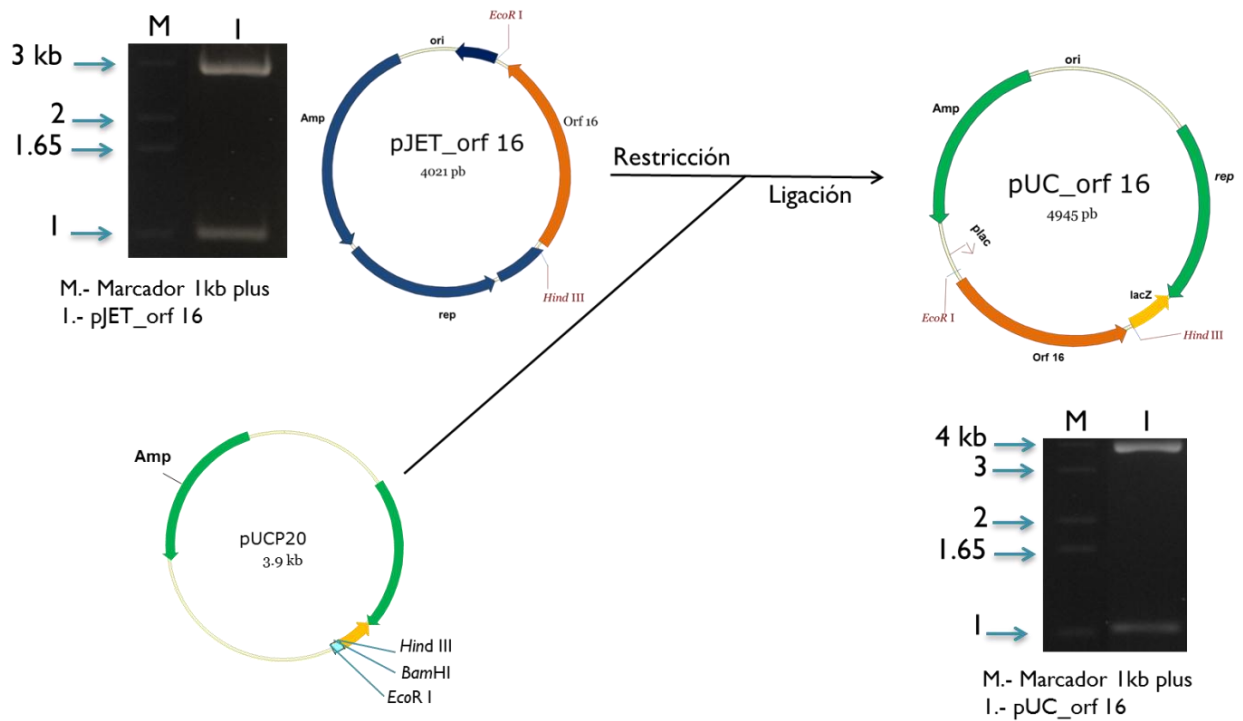


Figura 18. Estrategia de la clonación y subclonación del *orf 16*. El producto de PCR del *orf 16* se ligó con el vector pJET 1.2, se realizó una restricción enzimática con *Hind III* y *EcoR I* y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa (gel de la izquierda). Posteriormente el DNA correspondiente al *orf 16* se subclonó en el vector pUCP20, se extrajo el plásmido recombinante, se realizó otra restricción enzimática con *Hind III* y *EcoR I* y se corrió un gel de agarosa para caracterizar la subclonación (gel de la derecha). Marcador de 1 kb plus (M).

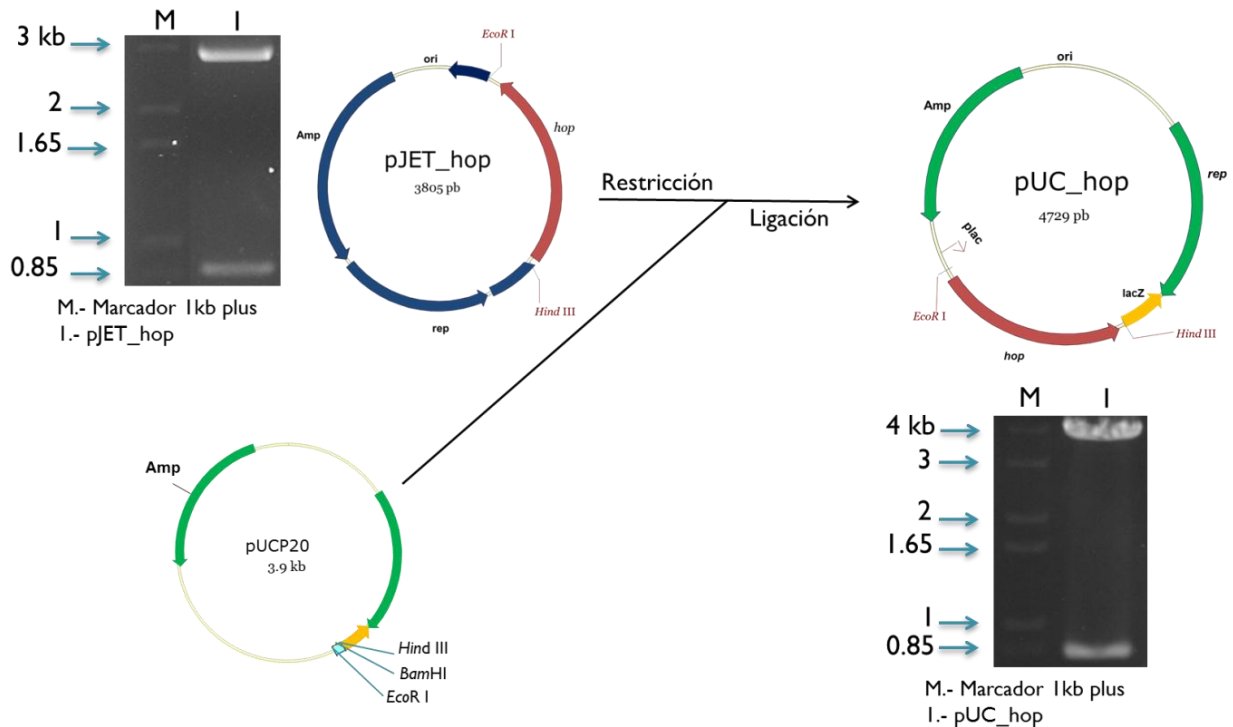


Figura 19. Estrategia de la clonación y subclonación del *orf* 42 (*hop*). El producto de PCR del *orf* 42 se ligó con el vector pJET 1.2, se realizó una restricción enzimática con *Hind* III y *Eco*R I y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa (gel de la izquierda). Posteriormente el DNA correspondiente al *orf* 42 se subclonó en el vector pUCP20, se extrajo el plásmido recombinante, se realizó otra restricción enzimática con *Hind* III y *Eco*R I y se corrió un gel de agarosa para caracterizar la subclonación (gel de la derecha). Marcador de 1 kb plus (M).

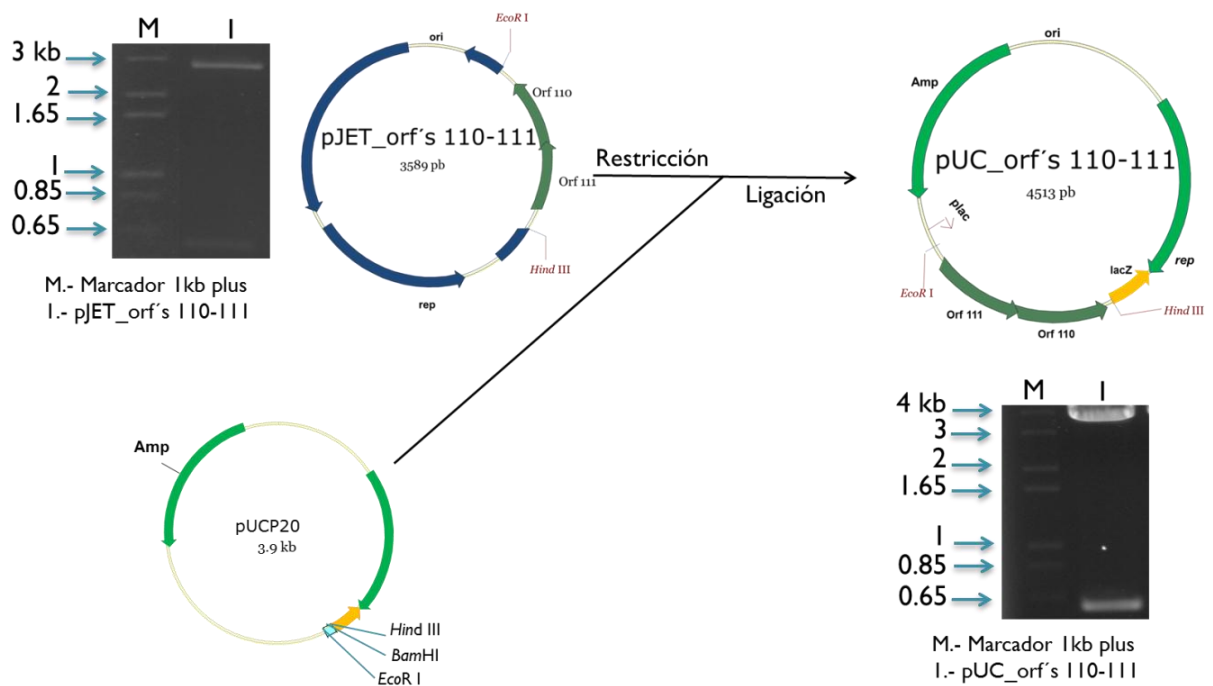


Figura 20. Estrategia de la clonación y subclonación de los orfs 110-111. El producto de PCR de los orfs 110-111 se ligó con el vector pJET 1.2, se realizó una restricción enzimática con *Hind III* y *EcoR I* y se realizó una electroforesis en un gel de agarosa (gel de la izquierda). Posteriormente el DNA correspondiente a los orfs 110-111 se subclonó en el vector pUCP20, se extrajo el plásmido recombinante, se realizó otra restricción enzimática con *Hind III* y *EcoR I* y se corrió un gel de agarosa para caracterizar la subclonación (gel de la derecha). Marcador de 1 kb plus (M).

En *E. coli* los *orfs* 1, 16 y 42 incrementaron el número de UFC recuperadas de los ensayos de virulencia en hojas de lechuga de 2 o más veces con respecto al control; sin embargo, la clona con los *orfs* 110-111 no mostró una diferencia respecto al control (**Figura 21A**). En *P. aeruginosa*, sólo el *orf* 42 mostró un incremento en el grado de virulencia con respecto al control. Este resultado concuerda con el fenotipo de virulencia conferido por este gen en *E. coli*, el resto de las transformantes no mostraron diferencia respecto al control (**Figura 21B**).

8.4. Efecto del sistema Quorum-sensing en la virulencia generada por los *orfs* de pUM505

Debido a que en *P. aeruginosa* la virulencia es regulada por el sistema de “Quorum-sensing”, se determinó si este sistema regula la virulencia conferida por los genes de pUM505. Para ello el plásmido se transfirió a la mutante *lasI* y la doble mutante *lasI/rhlI* de *P. aeruginosa*. Dichas mutantes, además de tener atenuado el sistema “Quorum-sensing”, son mutantes con la virulencia disminuida (Ortiz-Castro y col., 2011). El plásmido pUM505 fue capaz de conferir resistencia a $K_2Cr_2O_7$ en las mutantes *lasI* y *lasI/rhlI* (**Figura 22A**), debido a que poseen el gen *chrA* de resistencia al ion cromato presente en el plásmido. Adicionalmente, se amplificó un fragmento del gen *merA* (*orf* 70) de aproximadamente 2.7 kb, usando los oligonucleotidos correspondientes (**Figura 22B**). Estos resultados confirmaron que el plásmido pUM505 se transfirió a las mutantes *lasI* y *lasI/rhlI*.

A las exconjugantes *lasI* y *lasI/rhlI* con pUM505 se les determinó el nivel de virulencia en el modelo de hojas de lechuga, en donde se utilizó a *P. aeruginosa*

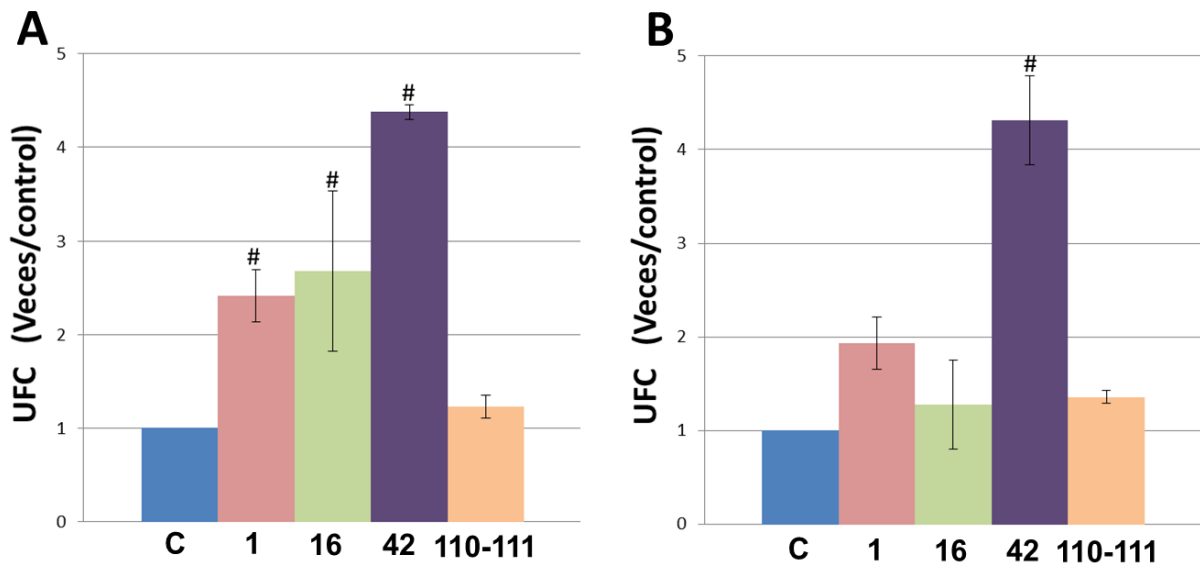


Figura 21. Participación de los orfs 1, 16, 42 y 110-111 de pUM505 en la virulencia. Determinación de las UFC de las transformantes con los orfs 1, 16, 42 y 110-111 en ensayos de virulencia en hojas de lechuga, en donde C, corresponde al control. A) *E. coli* Top10 y B) *P. aeruginosa* PAO1. Con un numeral (#) se señalan las clonas con diferencia estadísticamente significativa respecto al control. En las gráficas se estandarizó el control a 1.0 para disminuir la variación. Se muestran los datos de 3 experimentos independientes.

PAO1 como control, la mutante *lasI* y la doble mutante *lasI/rhlI* como controles sensibles, así como ambas exconjugantes con el plásmido pUM505. Se observó que las mutantes *lasI* y *lasI/rhlI* no generaron lesión en la hoja de lechuga en comparación con PAO1 (**Figura 23A**).

Interesantemente, las exconjugantes con el plásmido pUM505 tampoco generaron lesión, a diferencia de lo que se había observado cuando pUM505 se transfirió a *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) (**Figura 8A y B**). El conteo de las UFC mostró que las mutantes, así como las exconjugantes con el plásmido pUM505, no incrementaron las UFC respecto al control (**Figura 23B**). Esto sugiere que los genes de virulencia del plásmido pUM505 son dependientes del sistema de Quorum-sensing. Al no detectarse aumento en la virulencia en las mutantes en presencia de pUM505, se transfirieron los plásmidos de las clonas EH 8, EH 24, EH 26 y EH 28 que contienen genes específicos de pUM505 a las mutantes *lasI* y *lasI/rhlI*, con el propósito de determinar qué genes son regulados por el sistema “Quorum-sensing”. Los resultados mostraron que no existen diferencias en el área de lesión, ni en las UFC cuando se tienen clonados los plásmidos recombinantes en las mutantes (**Figura 24 A y B**).

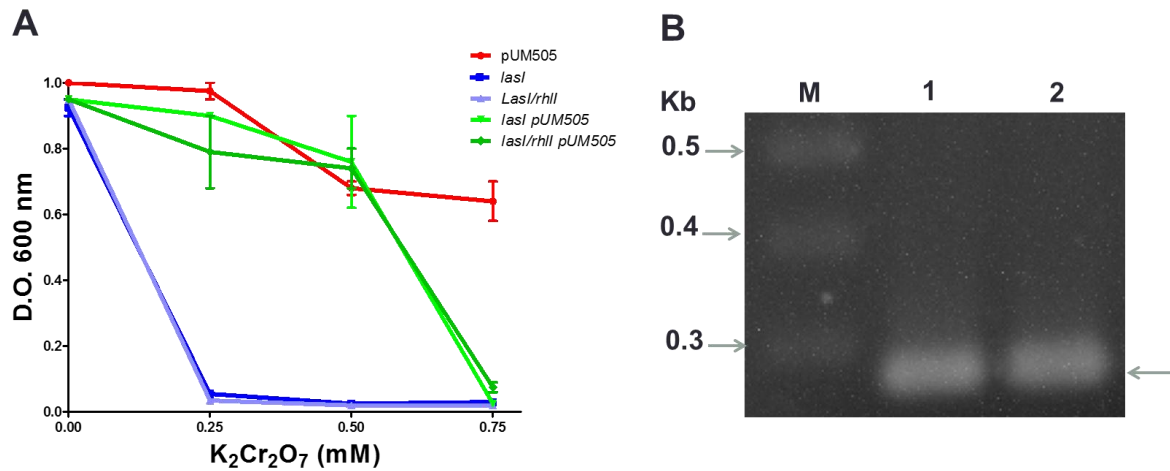


Figura 22. Caracterización de las mutantes *lasI* y *lasI/rhlI* transformadas con el plásmido pUM505. A) Pruebas de susceptibilidad a K₂Cr₂O₇ de las mutantes con y sin el plásmido pUM505, realizadas en caldo nutritivo a 37 °C durante 18 h. Se muestran datos representativos de tres experimentos independientes, Rojo, *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505); Verde, *lasI* (pUM505) y *lasI/rhlI* (pUM505); Azul, *lasI* y *lasI/rhlI*. B) Amplificación por PCR del gen *merA*. M, es el marcador de 1 kb plus; carril 1, producto de PCR empleando el DNA de *lasI* (pUM505); carril 2, producto de PCR empleando el DNA de *lasI/rhlI* (pUM505).

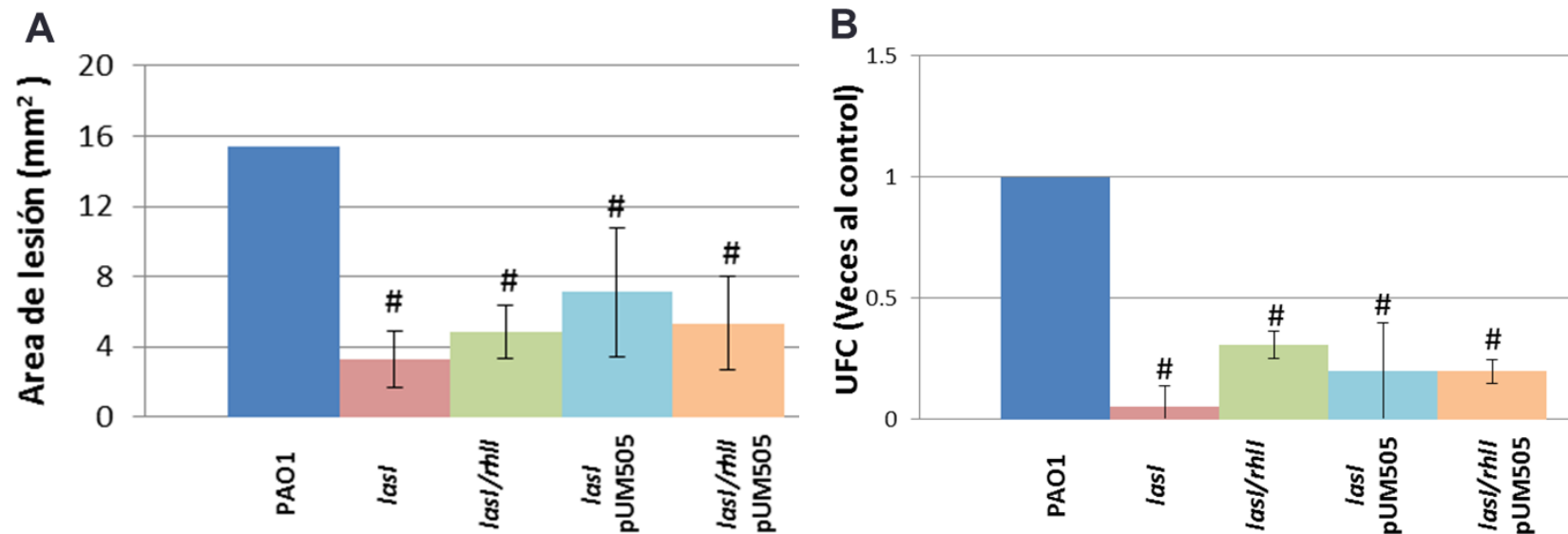


Figura 23. Análisis de la virulencia de las exconjugantes *lasI* y *lasI/rhlI* con el plásmido pUM505. A) Gráfica del área de la lesión en el modelo de hojas de lechuga y B) Determinación de las UFC obtenidas de las lesiones de las hojas de lechuga. Con un numeral (#) se señalan las clonas con diferencia significativa estadísticamente respecto al control. Datos de 4 experimentos independientes.

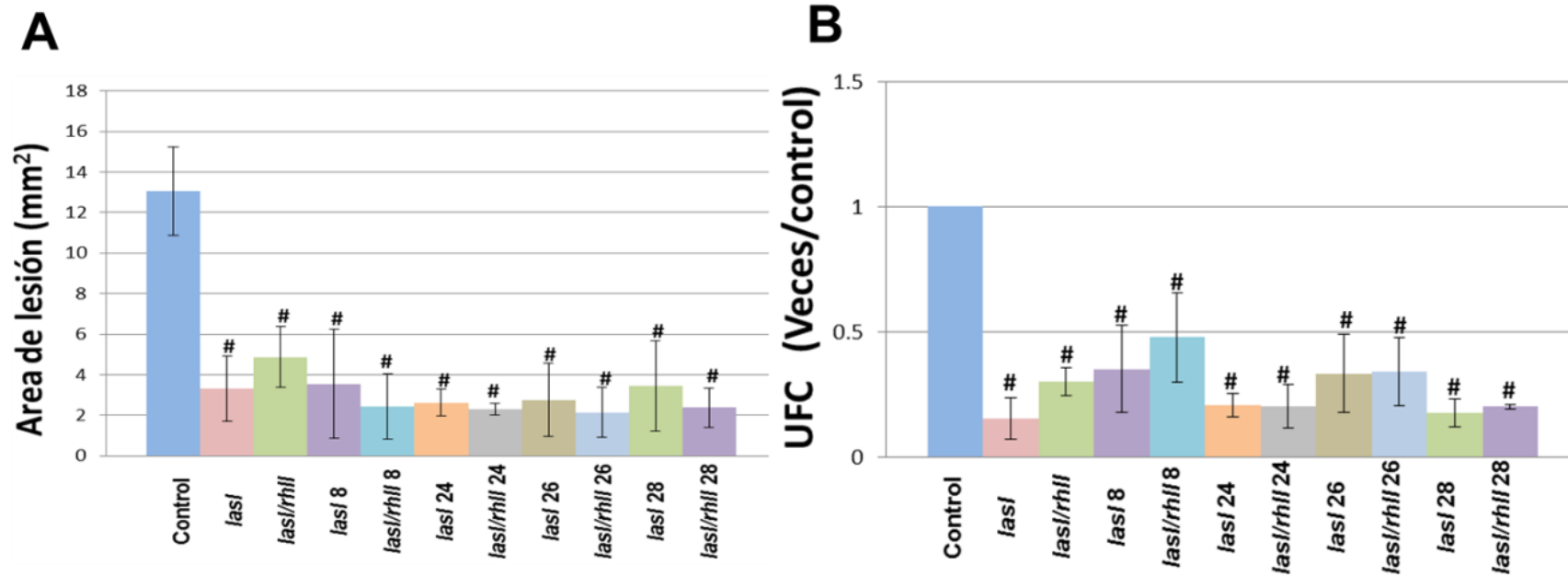


Figura 24. Análisis de la virulencia de las mutantes *lasI* y *lasI/rhlI* con los plásmidos recombinantes de las clonas EH8, EH 24, EH 26 y EH 28. A) Gráfica el área de la lesión en el modelo de hojas de lechuga y B) Determinación de las UFC obtenidas de las hojas de lechuga de *P. aeruginosa* PAO1, las mutantes *lasI* y *lasI/rhlI* y las mutantes con los plásmido de las clonas EH 8, EH 24, EH 26 y EH 28. Con un numeral (#) se señalan las clonas con diferencia estadísticamente significativa respecto al control. Datos de 3 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

El plásmido pUM505 fue secuenciado y analizado en 2011 por Ramírez-Díaz y colaboradores, determinando que éste es un replicón circular que posee 123,322 pb y que contiene 138 regiones codificantes (**Figura 3**). Éste presenta dos regiones bien definidas, una primer región de ~31 kb que corresponde a una GI que contiene genes de resistencia a metales, y una región aún más grande, de ~67 kilobases (kb) que corresponde a una isla de patogenicidad (PAI). La PAI de pUM505 consiste de 78 marcos de lectura abiertos (*orfs* 1-51 y 112-138) de los cuales 64 han sido encontrados en las islas de patogenicidad de *P. aeruginosa* PA14, la cual tiene dos islas de patogenicidad bien caracterizadas: PAPI-1 con un tamaño de 108 kb y PAPI-2 con un tamaño de 11 Kb (**Figura 4**) (He y col., 2004). Aunque PA14 y PAO1 comparten el mismo rango de hospederos, PA14 es mucho más virulenta en varios organismos modelo (Rahme y col., 1995; Rahme y col., 2000), esto debido a la presencia de las islas PAPI-1 y PAPI-2 (**Figura 5**) (Harrison y col., 2010). La isla PAPI-1 está ausente de la cepa de referencia PAO1, mientras que sólo una parte de la isla más pequeña PAPI-2 se encuentra en este aislado. La mayoría de las proteínas predichas codificadas por los genes de las PAPI-1 no muestran homología con ninguna otra proteína de función conocida, y la mutación de varios de estos genes revela su relevancia en la virulencia tanto en vegetales como animales. Lo anterior nos muestra que las funciones de virulencia de PAPI-1 y PAPI-2 promueven la amplia variedad de cepas altamente virulentas de *P. aeruginosa*, como PA14 (He y col., 2004). Interesantemente, islas con homología a PAPI-1 y/o PAPI-2 se han identificado en

otras cepas de *P. aeruginosa* y otras especies bacterianas (He y col., 2004; Kulasekara y col., 2006; Juhas y col., 2007; Klockgether y col., 2007; Wiehlmann y col., 2007; Wurdemann y Tummler, 2007; Battle y col., 2008 Battle y col., 2009). Esto podría sugerir que ambas islas tienen un origen en común, sin embargo, la presencia de islas de virulencia contenidas en plásmidos conjugativos como la PAI de pUM505 puede tener una mayor relevancia al incrementar la transferencia de la misma.

Como se ha descrito, las islas genómicas presentan varias características, entre ellas están: tener un tamaño entre 10 a 200 kb; contenido comúnmente diferente de guanina y citosina (GC) respecto al resto del cromosoma, entre otros (Schmidt y Hensel, 2004). No obstante, la PAI de pUM505 contiene genes que codifican integrasas y factores relacionados a sistemas de conjugación y se le llamó isla de patogenicidad debido a la homología con genes de la isla PAPI-1 y PAPI-2 de *P. aeruginosa* PA14 (Ramírez-Díaz y col, 2011); sin embargo, la participación de pUM505 en la virulencia no había sido determinada hasta antes de este trabajo.

Además de las islas PAPI-1 y PAPI-2 de *P. aeruginosa* PA14, se conocen otras islas de patogenicidad, por ejemplo la cepa PSE9 de *P. aeruginosa*, la cual es altamente virulenta en plantas y animales, contiene siete islas, incluyendo a la isla PAPI-1 (primer isla genómica encontrada en *P. aeruginosa*) (Liang y col., 2001), y las islas PAPI-2, 3, 4, 5, 6 y 7, siendo la isla PAPI-5 la que posee los genes requeridos para la virulencia en mamíferos (Battle y col., 2008). Otra de las PAI encontradas en *P. aeruginosa*, es pKLC102, esta isla se encontró en la cepa "Clone C", tiene un tamaño de 104 kb. Ésta se ha identificado en varias cepas de *P. aeruginosa*, así como también a la isla PAPI-2, en donde al hacer ensayos de

movilización de ambas, se observó que pKLC102 presentaba un 10% de frecuencia de movilización, comparada con PAPI-2 que presentó un 0.3%. Al analizar el número de copias se observó que pKLC102 presenta 30 copias por célula, encontrando un origen de replicación para *P. aeruginosa*. De esta manera se demostró que la isla pKLC102 puede estar integrada en el cromosoma o puede estar formando un plásmido, incrementando la transferencia de dicha isla (Klockgether y col., 2007). Algunos genes de la PAI de pUM505 tienen homología con genes de PAPI-1 y PAPI-2 de PA14. Se ha reportado que algunos genes de estas islas están relacionados con la virulencia debido a mutaciones al azar en los genes de PAPI-1 y PAPI-2 de *P. aeruginosa* PA14. Se determinó que 19 genes participan en la virulencia en *Arabidopsis thaliana* así como ratones (He y col., 2004). Por ejemplo, se ha descrito homología con el efector dependiente del SST3 (RL030), homólogo al gen *hop* (*orf* 42) de pUM505, el conjunto de genes que codifican el pilus (RL077-86), homólogos a los *orfs* 113-124 de pUM505. Otros genes reportados en virulencia son los que codifican proteínas chaperonas (RL040-44), los genes que codifican la pirocina S5, una proteína tóxica y una proteína de inmunidad (RL087-8) los cuales no tienen homólogos en pUM505 (Briand y Baysse, 2002). Además genes como los RL101, RL003, RL014, RL017, RL018 y RL020 homólogos a los *orfs*: *orf* 2 que codifica una PH, *xerD* (*orf* 22) que codifica una recombinasa, *traG* (*orf* 26) una proteína de membrana, *orf* 28 una PH, *orf* 29 una proteína de membrana, *orf* 32 una posible disulfuro isomerasa, respectivamente, presentes en el plásmido pUM505, han sido reportados en virulencia (He y col., 2004; Ramírez-Díaz y col., 2011). El resto de los genes de PAPI-1 codifican proteínas con funciones relacionadas con la movilización de

DNA, integración y las actividades de partición. Muchos de los genes que codifican a proteínas predichas en PAPI-1 han sido identificados en *Salmonella*, cepas de *E. coli* patógenas, *Haemophilus somnus*, *Yersinia pestis*, *P. aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Xylella fastidiosa*, *Burkholderia fungorum* y *Xanthomonas*; sin embargo, la mayoría de los genes de PAPI-1 codifica proteínas de función aún no determinada (He y col., 2004).

Con el uso del modelo de hojas de lechuga, el cual ya ha sido usado en otros estudios para determinar la virulencia de diferentes cepas o aislados clínicos (Rahme y col., 1995; Filiatrault, 2006; Battle y col., 2008), se observó que la cepa PAO1 con el plásmido pUM505, incrementa el área de lesión respecto a la cepa que no contiene dicho plásmido, así como también incrementó la capacidad de colonización de la cepa, al mostrar un aumento de las UFC (**Figura 8**). Resultados similares han sido descritos con islas de patogenicidad en donde la presencia de éstas incrementan la virulencia (He y col., 2003; Filiatrault, 2006; Battle y col., 2008; Carrilla-Latorre y col., 2008; Harrison y col., 2010; Toska y col., 2014). Además de determinar que pUM505 incrementa la virulencia, se identificaron genes que están involucrados en dicho fenotipo. Para esto, se construyó una biblioteca de genes del plásmido pUM505. Se obtuvo un total de 120 clonas, de las cuales se tomó una muestra de 45 clonas para analizar por patrón de restricción que la biblioteca de genes fuera heterogénea, se observó que la mayoría de los fragmentos clonados tienen un tamaño entre 2 y 3 kb (**Figura 11**); esto concuerda con lo predicho en la restricción teórica total del plásmido pUM505, en donde al usar las enzimas *HindIII/EcoRI* y *HindIII/BamHI*, se obtendrían fragmentos de entre 0.5 a 5.6 kb y 0.8 a 5.3 kb respectivamente.

En el análisis de la virulencia de las 120 clonas de *E. coli* Top10, la cual no es una cepa virulenta, en el modelo de hojas de lechuga se encontró que 15 de las clonas mostraron un incremento en la virulencia (**Figura 12**). Se ha descrito que uno o pocos genes en *E. coli* pueden volver virulenta la cepa. Un estudio con 4000 personas en Alemania infectadas por *E. coli* serotipo O104:H4, reveló que más del 22 % de los pacientes presentaron síndrome urémico hemolítico, aunado a la producción de la toxina shiga (Stx), sugiriendo que la virulencia es debida a la adherencia y la formación de biopelículas combinada con la producción de Stx (Richter y col., 2014). Otro ejemplo es el de la proteína HilA, la cual es un regulador maestro de la isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* (SPI1), que tiene homología con AilA y YgeH que son codificadas en una isla de patogenicidad de la cepa de *E. coli* O157, entero hemorrágica (Hüttener y col., 2014). Adicionalmente se ha reportado que algunos genes de PAPI-1 se encuentran en cepas de *E. coli* patógenas (He y col., 2004).

Para considerar virulentas a las clonas de la biblioteca de pUM505 se estableció que incrementarán por lo menos de dos veces el número de las UFC recuperadas de las lesiones de la hoja de lechuga con respecto al control (*E. coli* Top 10). Para descartar la posibilidad de que el vector pUCP20, estuviera confiriendo una ventaja de crecimiento sobre la cepa de *E. coli* Top10, se realizaron ensayos de virulencia en hojas de lechuga con la cepa *E. coli* Top10 con y sin el vector, en donde no hubo diferencias, concluyendo que la diferencia en la virulencia entre las clonas se debe a los genes que contienen clonados. Anteriormente, se ha empleado *E. coli* como hospedero heterólogo de genes provenientes de *P. aeruginosa*; por ejemplo, se ha descrito la actividad de la fosfolipasa C hemolítica

de *P. aeruginosa* clonada en *E. coli* BL21 en condiciones optimizadas de fermentación (Zhao y col., 2013), así como los genes phaC1 y phaC2 encontrados en *P. aeruginosa*; ambos genes codifican enzimas capaces de degradar plásticos de polihidroxicanoatos. Dichos genes se clonaron en *E. coli* BL21 y demostraron que son capaces de sintetizar altos niveles de proteína (Abedi y col., 2012). Posteriormente, se transfirieron los 15 plásmidos recombinantes que incrementaron la virulencia de *E. coli* Top10 a *P. aeruginosa* PAO1 y se usó el modelo de hojas de lechuga con las transformantes en *P. aeruginosa*. Encontrando que de las 15 transformantes, cuatro mostraron un incremento de la virulencia, aumentando el área de lesión así como de las UFC (**Figura 13**). Sin embargo, para estudios posteriores se seleccionaron las cuatro clonas que incrementaron las UFC un mínimo de dos o más veces respecto a *P. aeruginosa* PAO1 sin plásmido. Para descartar la posibilidad de que los plásmidos recombinantes afectaran la velocidad de crecimiento, se realizaron cinéticas de crecimiento de las 4 clonas de *P. aeruginosa* que incrementaron la virulencia (EH 8, EH 24, EH 26 y EH 28), así como de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505). En este ensayo no se observó diferencia en la velocidad de crecimiento de ninguna de las clonas (**Figura 14**), lo que indica que el incremento de las UFC en la lechuga es debido a la capacidad de colonización de cada una de las clonas. Además, utilizando medio M9, se realizaron cinéticas de crecimiento de la transformante en *P. aeruginosa* (EH 28) y *P. aeruginosa* PAO1 observándose velocidades de crecimiento similares, igual que en el 2006, Filiatrault y colaboradores realizaron cinéticas de crecimiento con un banco de mutantes observando que la velocidad de crecimiento no era afectada por las

mutaciones; siendo que el medio M9 es bajo en nutrientes y simula un ambiente de crecimiento similar al de la hoja de lechuga, lo que indica que el incremento de las UFC en la lechuga es debido a los genes clonados y no a la velocidad de crecimiento. Para identificar a los genes en los plásmidos recombinantes responsables de incrementar la virulencia de *E. coli*, se secuenciaron los fragmentos clonados. Se obtuvo la secuencia de siete fragmentos, de los cuales cinco pertenecen a la PAI de pUM505 identificados en las clonas (EH 8, EH 24, BH 10, BH 19 y EH 40) y dos están fuera de la PAI (EH 26 y EH 28) y tienen insertos de tamaño entre 1.8 a 5.5 kb (**Figura 15**).

El análisis de las secuencias indicó que la clona EH 24, contiene cinco *orfs*, de los cuales, el *orf 2*, tiene homología con RL101 perteneciente a la isla PAPI-1 de *P. aeruginosa* PA14, dicho *orf* se mutó y se observó que la virulencia disminuye en *Arabidopsis thaliana* y en ratones; sin embargo, la proteína codificada por dicho gen no se ha caracterizado (He y col., 2004).

Las clonas BH 10 y BH 19 contienen dos *orfs*, los *orf 16* y *17* de pUM505 los cuales forman un probable operón; ambos *orfs*, codifican PHs, sin embargo, el *orf 17* tiene un dominio con homología a un gen perteneciente al bacteriófago Lambda, el cual es capaz de modular la actividad del sistema de restricción y modificación de *E. coli* K-12. Dicho gen se ha reportado que está involucrado en virulencia (King y Murray, 1995).

Otro de los genes ya reportados en virulencia, es el gen *traG*, que se encontró en la clona BH 40; el gen *traG* se indentificó en el plásmido pIP501 presente en aislados de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (Arends y col., 2013). La proteína TRAG se purificó y se demostró que posee actividad degradante de

peptidoglicano para posiblemente facilitar la inserción de la maquinaria del sistema de secreción tipo IV (Abajy y col., 2007; Alvarez y Christie, 2009; Arends y col., 2012). Además, se sabe que el sistema de secreción tipo III de *P. aeruginosa* utiliza una proteína con capacidad de degradación del peptidoglicano, sitio en donde se ensambla el SST3, siendo éste el principal factor de virulencia (Büttner, 2012).

Otro de los genes que ya han sido involucrados en virulencia es el gen *tnpA*, que se encontró en la clona EH 26; se han reportado genes homólogos en *Helicobacter pylori*, la presencia de *tnpA* en pacientes con cáncer gástrico sugiere un papel de dicho gen en el desarrollo de ésta patología. Además, la infección por *H. pylori* en otro estudio con pacientes en Brasil mostraron una prevalencia del gen *tnpA* de un 47,5% en cáncer gástrico y gastritis (Mattar y col., 2010; Abadi y col., 2014). En otro estudio sobre el gen *tnpA*, en donde se obtuvieron 215 aislados de *H. pylori*, se observó que el 63% de dichos aislados presentaron al gen (Malekzadeh y col., 2009).

La clona EH 8 contiene clonado al *orf* 111 de pUM505, éste tiene un homólogo en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, el cual es un patógeno de peces que causa una enfermedad conocida como pasteurelisis. Dicho gen se encontró en los plásmidos pP99-018 y pP91278, provenientes de Japón y Estados Unidos respectivamente y codifica una permeasa que confiere resistencia a la bacteria en contra del pez y ya se ha descrito como factor de virulencia (Kim y col., 2008). La única clona que no presentó algún gen involucrado previamente en virulencia fue EH 28, la cual sólo tiene clonado al *orf* 97, cuya función se desconoce, debido a que codifica una PH (**Tabla 2**).

Todos los resultados hasta este momento mostraron que pUM505 contiene por lo menos once genes con homólogos involucrados previamente en virulencia, de los cuales cinco se encontraron en la biblioteca de genes de este trabajo y se determinó que incrementan la virulencia de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Además, se sabe que 64 de los 78 *orfs* de la isla de patogenicidad son homólogos a los *orfs* de PAPI-1 y PAPI-2 de *P. aeruginosa* PA14, lo que confirma que el plásmido pUM505 tiene genes involucrados en virulencia.

Al hacer la clonación individual o en conjunto de los *orfs* seleccionados, los *orfs* 1, 16 y 42 mostraron incremento de la virulencia de *E. coli*, sin embargo, en *P. aeruginosa*, sólo el *orf* 42 generó un incremento (**Figura 21**). Los *orf* 1 y 16 codifican PHs cuya función se desconoce, pero el *orf* 42 posee homología con el gen *hop*; en *Pseudomonas syringae* *hop* codifica un efector del SST3, el cual es inyectado en células vegetales por el SST3 y produce daño a dichas células observándose lesiones en las hojas (Fouts y col., 1997; Guttman y col., 2002; Petnicki y col., 2002; Zwiesler y col., 2002; Buell y col., 2003; Greenberg y Vinatzer, 2003; Lindeberg y col., 2005).

Además, se ha reportado que dicha proteína causa daño a la planta del tomate, debido a que *P. syringae* es patógena para la misma (Alfano y col., 2000; Badel y col., 2002). Se ha reportado que este efector es tóxico cuando se expresa en células de levadura (Munkvold y col., 2008). La eliminación de *hop* reduce la formación de lesiones necróticas en las hojas de tomate (Lindeberg y col., 2005), lo que sugiere que el *orf* 42 codifica una proteína efectora del SST3, la cual incrementa el daño de la hoja de lechuga al estar clonado tanto en *E. coli* como en *P. aeruginosa*.

Los resultados muestran que el plásmido pUM505 tiene varios genes homólogos a los ya reportados en virulencia y que la transferencia de algunos de estos incrementan la virulencia de *E. coli* y *P. aeruginosa*, por lo que se puede concluir que el plásmido pUM505 contiene genes involucrados en virulencia, y que la presencia de éste incrementa la patogenicidad de *P. aeruginosa*.

Como ya se había descrito, la comunicación célula a célula por medio de moléculas difusibles permite que las bacterias desencadenen respuestas coordinadas para lograr resultados que de otro modo resultarían imposibles para una sola célula (Jiménez y col., 2012). Es este sentido el “Quorum-sensing” regula procesos importantes como la formación de biopelículas y la expresión de factores de virulencia (Barreto, 2011). En *P. aeruginosa* coexisten dos sistemas de AHL: el sistema Las y el Rhl. El sistema Las controla la producción de múltiples factores de virulencia involucrados en infecciones agudas y daño a las células hospederas, incluyendo a LasA, LasB, elastasas, exotoxina A y la proteasa alcalina (Toder y col., 1991; Gambello y col., 1993; Jones y col., 1993; Passador y col., 1993). El segundo sistema, el Rhl, regula la expresión de varios genes, incluyendo genes responsables de la producción de rhamnolípidos, y reprimiendo genes de respuesta para ensamblaje y función del SST3, el mayor determinante de infecciones en humanos, el cual permite liberar proteínas tóxicas dentro del citoplasma de células eucariotas (Bleves y col., 2005).

En este trabajo se transfirió el plásmido pUM505 a la mutante *lasI* y la doble mutante *lasI/rhlI*, para determinar si el sistema “Quorum-sensing” regula los genes involucrados en virulencia de dicho plásmido. Las mutantes *lasI* pUM505 y *lasI/rhlI* pUM505 no mostraron un incremento en la virulencia respecto a las mutantes sin

el plásmido (**Figura 23**), en comparación con lo observado previamente al transferir el plásmido pUM505 a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 8**). La virulencia de *P. aeruginosa* es regulada por el sistema “Quorum-sensing”, en donde genes de respuesta para ensamblaje y función del SST3 son regulados por el autoinductor N-butanoil homoserina lactona (C₄-HSL) el cual es producido por la proteína codificada por *RhlI* (Pearson y col., 1995; Bleves y col., 2005). Además, la proteína LasI codificada por el gen *lasI*, produce y responde a N-3-oxo-dodecanoil homoserina lactona (3-oxo-C₁₂-HSL) (Passador y col., 1993; Rampioni, 2007), regulando múltiples factores de virulencia involucrados en infecciones agudas y en el daño a las células hospederas (Toder y col., 1991; Gambello y col., 1993; Jones y col., 1993; Passador y col., 1993). Cuando se transfirieron los plásmidos recombinantes de las clonas EH 8, EH 24, EH 26 y EH28 que incrementaron la virulencia de *E. coli* Top10 y *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 12 y 13**) a las mutantes *lasI* y *lasI/rhlI*, se detectó que no hay incremento de la virulencia respecto a las mutantes sin transformar (**Figura 24**), lo que se sugiere que los genes del plásmido pUM505 que incrementan la virulencia de *P. aeruginosa* son dependientes del sistema Quorum-sensing, ya que en *P. aeruginosa* PAO1 si se incrementó la virulencia (**Figura 13**).

Estos resultados muestran que el plásmido pUM505 contiene genes que están involucrados en virulencia, algunos ya reportados en otras cepas o especies y otros que hasta este trabajo se desconocía su participación. Además, se demostró que los genes de virulencia de dicho plásmido son regulados por el sistema “Quorum-sensing”. Sin embargo es interesante demostrar que estos genes incrementan la virulencia de otras cepas de *P. aeruginosa*.

CONCLUSIÓN

Genes del plásmido pUM505 incrementan la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*:

- Los genes involucrados en virulencia de pUM505 son regulados por el sistema “Quorum-sensing”.

BIBLIOGRAFÍA

Abadi A., Mobarez A., Bonten M., Wagenaar J. y Kusters J. 2014. Clinical relevance of the *cagA*, *tnpA* and *tnpB* genes in *Helicobacter pylori*. *BMC Gastroenterology*.14: 33.

Abajy M., Kopec J., Schiwon K., Burzynski M., Doring M., Bohn C. y Grohmann E. 2007. A type IV-secretion-like system is required for conjugative DNA transport of broad-host-range plasmid pIP501 in Grampositive bacteria. *J. Bacteriol.* 189: 2487–2496.

Alfano J., Charkowski A., Deng W., Badel J., Petnicki-Ocwieja T., Van-Dijk K. y Collmer A. 2000. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 4856-4861.

Alvarez-Martinez C. y Christie P. 2009. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73: 775–808.

Arends K., Celik E., Probst I., Goessweiner-Mohr N., Fercher C., Grumet L., Soellue C., Abajy M., Sakinc T., Broszat M., Schiwon K., Koraimann G., Keller W. y Grohmann E. 2013. TraG Encoded by the pIP501 Type IV Secretion System Is a Two- Domain Peptidoglycan-Degrading Enzyme Essential for Conjugative Transfer. *J. of Bacteriol.* 195: 4436–4444.

Arends K., Schiwon K., Sakinc T., Hubner J. y Grohmann E. 2012. Green fluorescent protein-labeled monitoring tool to quantify conjugative plasmid transfer between Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 895–899.

Badel J., Charkowski A., Deng W. y Collmer A. 2002. A gene in the *Pseudomonas syringae* pv. tomato Hrp pathogenicity island conserved effector locus, hopPtoA1, contributes to efficient formation of bacterial colonies in planta and is duplicated elsewhere in the genome. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 1014-1024.

Barreto A. 2011. Quorum sensing: sistemas de comunicación bacteriana. *Ciencia actual.* 1: 58-69.

Battle S., Meyer F., Rello J., Kung V. y Hauser A. 2008. The hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *J. Bacteriol.* 190: 7130–7140.

Battle S., Rello J. y Hauser A. 2009. Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 290: 70–78.

Bleves S., Soscia C., Nogueira-Orlandi P., Lazdunski A. y Filloux A. 2005. Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 187: 3898–3902.

Blum G., Ott M., Lischewski A., Ritter A., Imrich H., Tschape H. y Hacker J. 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* 62: 606–614.

Briand M. y Baysse C. 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie.* 84: 499–510.

Buchrieser C., Prentice M. y Carniel E. 1998. The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a highpathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes internal rearrangement. *J. Bacteriol.* 180: 2321–2329.

Buell C., Joardar V., Lindeberg M., Selengut J., Paulsen I., Gwinn M., Dodson R., Deboy R., Durkin A., Kolonay J., Madupu R., Daugherty S., Brinkac L., Beanan M., Haft D., Nelson W., Davidsen T., Zafar N., Zhou L., Liu J., Yuan Q., Khouri H., Fedorova N., Tran B., Russell D., Berry K., Utterback T., Van Aken S., Feldblyum T., D'Ascenzo M., Deng W., Ramos A., Alfano J., Cartinhour S., Chatterjee A., Delaney T., Lazarowitz S., Martin G., Schneider D., Tang X., Bender C., White O., Fraser C. y Collmer A. 2003. The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen 282 / Molecular Plant-Microbe Interactions *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 18: 10181-10186.

Büttner D. 2012. Protein Export According to Schedule: Architecture, Assembly, and Regulation of Type III Secretion Systems from Plant- and Animal-Pathogenic Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76: 262–310.

Carrilla-Latorre S., Calvo-Garrido J., Bloomfield G., Skelton J., Kay R., Ivens A., Martinez J. y Escalante R. 2008. *Dictyostelium* transcriptional responses to *Pseudomonas aeruginosa*: common and specific effects from PAO1 and PA14 strains. *BMC Microbiol.* 8: 109-124.

Cervantes C. y Ohtake H., 1988. Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 173–176.

Christie P., Atmakuri K., Krishnamoorthy V., Jakubowski S. y Cascales E. 2005. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 59: 451–485.

Cornelis G. y Wolf H. 1997. The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* 23: 861– 867.

Davies D., Parsek M., Pearson J., Iglewski B., Costerton J. y Greenberg E. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of bacterial biofilms. *Science*. 280: 295–298.

Dobrindt U., Hochhut B., Hentschel U. y Hacker J. 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 414-424.

Durfee T., Nelson R., Baldwin S., Plunkett G., Burland V., Mau B., Petrosino J., Qin X. y Muzny D. 2008. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J. Bacteriol.* 190: 2597–2606.

Elrod R. y Braun A. 1942. *Pseudomonas aeruginosa*: Its role as a plant pathogen. *J. Bacteriol.* 44: 633– 645.

Fajardo A., Martínez-Martín N., Mercadillo M., Galán J., Ghysels B., Matthijs S., Cornelis P., Wiehlmann L., Tümmler B., Baquero F. y Martínez J. 2008. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One*. 3: e1619.

Filiatrault M., Picardo K., Ngai H., Passador L., Iglewski B. 2006. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in virulence and anaerobic growth. *Infect. Immun.* 74: 4237-45.

Finck-Barbancon V., Goranson J., Zhu L., Sawa T., Wiener-Kronish J., Fleiszig S., Wu C., Mende-Mueller L. y Frank D. 1997. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol. Microbiol.* 25: 547–557.

Fink R. 1993. *Pseudomonas aeruginosa* the Opportunist: Pathogenesis and Disease (CRC, Boca Raton, FL). 1–5.

Finlay B. y Falkow S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 136–169.

Finlay W., Logan N. y Sutherlans A. 1999. Semiautomated Metabolic staining assay for *Bacillus cereus* emetic toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1811-1812.

Flores M., Aguilar G., Cabrera C., Guzmán J. y Flores M. 2011. El impacto biológico de los autoinductores bacterianos. *Rev. De la Sociedad Venezolana de Microbiología.* 31: 104-111.

Fouts D., Abramovitch R., Alfano J., Baldo A., Buell C., Cartinhour S., Chatterjee A., D'Ascenzo M., Gwinn M., Lazarowitz S., Lin N., Martin G., Rehm A., Schneider D., Van-Dijk K., Tang X. y Collmer A. 2002. Genome wide identification of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 2275-2280.

Fuqua C. y Greenberg E. 1998. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 183–189.

Fuqua W., Winans S. y Greenberg E. 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* 176: 269–275.

Galloway D. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited. *Mol. Microbiol.* 5: 2315–2321.

Gal-Mor O. y Finlay B. 2006. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell Microbiol.* 8: 1707–1719.

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

Glazebrook J., Campbell R., Hutchinson G. y Stallman N. 1978. Rodent zoonoses in North Queensland: the occurrence and distribution of zoonotic infections in North Queensland rodents. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 56: 147–156.

Grant C. y Vasil M. 1986. Analysis of transcription of the exotoxin A gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 168: 1112–1119.

Green S., Schroth M., Cho J., Kominos S. y Vitanza-jack V. 1974. Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.* 28: 987–991.

Greenberg J. y Vinatzer B. 2003. Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 20-28.

Guttman D., Vinatzer B., Sarkar S., Ranall M., Kettler G. y Greenberg J. 2002. A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* 295: 1722-1726.

Hacker J., Bender L., Ott M., Wingender J., Lund B., Marre R. y Goebel W. 1990. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathog.* 8: 213–225.

Hacker J., Knapp s. y Goebel W. 1983. Spontaneous deletions and flanking regions of the chromosomally inherited hemolysin determinant of an *Escherichia coli* O6 strain. *J. Bacteriol.* 154: 1145–1152.

Hammer A., Pedersen K., Andersen T., Jorgensen J. y Dietz H. 2003. Comparison of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from mink by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 94: 237–243.

Harrison E., Carter M., Luck S., Ou H., He X., Deng Z., O'Callaghan C., Kadioglu y Rajakumar K. 2010. Pathogenicity Islands PAPI-1 and PAPI-2 Contribute Individually and Synergistically to the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA14. *Am. Soc. Microbiol.* 4: 1437–1446.

Hassan H. y Fridovich I. 1980. Virulence and Defense in Host--Pathogen Interactions. *J. Bacteriol.* 141: 1556–1163.

Hauser A., Kang P. y Engel J. 1998. PepA, a novel secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Mol. Microbiol.* 27: 807–818.

He J., Baldini R., Deziel E., Saucier M., Zhang Q., Liberati N., Lee D., Urbach J., Goodman H. y Rahme L. 2004. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 2530–2535.

Henderson I., Navarro-Garcia F., Desvaux M., Fernandez R. y Ala'Aldeen D. 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 692–744.

High N., Hales B., Jann K. y Boulnois G. 1988. A block of urovirulence genes encoding multiple fimbriae and hemolysin in *Escherichia coli* O4:K12:H. *Infect. Immun.* 56: 513–517.

Hogan D. y Kolter R. 2002. *Pseudomonas-Candida* interactions: an ecological role for virulence factors. *Science* 296: 2229–2232.

Holloway B. 1955. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 13: 572–581.

Hüttener M., Dietrich M., Paytubi S. y Juárez A. 2014. HilA-like regulators in *Escherichia coli* pathotypes: the YgeH protein from the enteroaggregative strain 042. *BMC Microbiol.* 14: 268.

Iglewski B., Rust L. y Bever R. 1990. in *Pseudomonas: Biotransformations, Pathogenesis, and Evolving Biotechnology*. *Am. Soc. Microbiol.* 36–43.

Jander G., Rahme L. y Ausubel F. 2000. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J. Bacteriol.* 182: 3843–3845.

Jímenez P., Koch G., Thompson J., Xavier K., Cool R. y Quax W. 2012. The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 76: 46-65.

Johnson T., Wannemuehler Y. y Johnson S. 2007. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1976-1983.

Jones S., Yu B., Bainton N., Birdsall M., Bycroft B., Chhabra S., Cox A., Golby P., Reeves P. y Stephens S. The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J.* 12: 2477–2482.

Juhas M., Power P., Harding R. et al. 2007. Sequence and functional analyses of *Haemophilus spp.* genomic islands. *Genome Biol.* 8: R237.

Juhas M., Crook D y Hood D. 2008. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cel. Microbiol.* 10: 2377-2386.

Kawaharajo K., Homma J., Aoyama Y., Okada K. y Morihara K. 1975. Bacterial enzymes and virulence. *Jpn. J. Exp. Med.* 45: 79–88.

King G. y Murray N. 1995. Restriction alleviation and modification enhancement by the Rac prophage of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 16: 769-77.

Klockgether J., Wurdemann D., Reva O., Wiehlmann L. y Tummler B. 2007. Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189: 2443–2459.

Knapp S., Then I., Wels W., Michel G., Tschape H., Hacker J. y Goebel W. 1985. Analysis of the flanking regions from different haemolysin determinants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 200: 385–392.

Knapp S., Hacker J., Jarchau T. y Goebel W. 1986. Large, unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* O6 strain 536. *J. Bacteriol.* 168: 22–30.

Kopp E. y Medzhitov R. 1999. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 11: 13-8.

Kukavica-Ibrulj I., Bragonzi A., Paroni M., Winstanley C., Sanschagrín F., O’Toole G. y Levesque R. 2008. In vivo growth of *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14 and the hypervirulent strain LESB58 in a rat model of chronic lung infection. *J. Bacteriol.* 190: 2804–2813.

Kulasekara B., Kulasekara H., Wolfgang M., Stevens L., Frank D. y Lory S. 2006. Acquisition and evolution of the *exoU* locus in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 11: 4037-50.

Larbig K., Christmann A., Johann A., Klockgether J., Hartsch T., Merkl R., Wiehlmann L., Fritz H. y Tummeler B. 2002. Gene islands integrated into tRNA(Gly) genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. J. Bacteriol. 184: 6665–6680.

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

Lawley T., Klimke W., Gubbins M. y Frost L. 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. FEMS Microbiol. Lett. 224: 1–15.

Lee D., Urbach J., Wu G., Liberati N., Feinbaum R., Miyata S., Diggins L., He J., Saucier M., Déziel E., Friedman L., Li L., Grills G., Montgomery K., Kucherlapati R., Rahme L. y Ausubel F. 2006. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. Genome Biol. 7: R90.

Liang X., Pham X., Olson M. y Lory S. 2001. Identification of a genomic island present in the majority of pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 3: 843-853.

Low D., David V., Lark D., Schoolnik G. y Falkow S. 1984. Gene clusters governing the production of hemolysin and mannose-resistant hemagglutination are closely linked in *Escherichia coli* serotype O4 and O6 isolates from urinary tract infections. Infect. Immun. 43: 353–358.

Lutter E., Purighalla S., Duong J. y Storey D. 2012. Lethality and cooperation of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing mutants in *Drosophila melanogaster* infection models. Microbiol. 158: 2125-2132.

Lindeberg M., Stavrinides J., Chang J., Alfano J., Collmer A., Dangl J., Greenberg J., Mansfield J. y Guttman D. 2005. Proposed Guidelines for a Unified Nomenclature and Phylogenetic Analysis of Type III Hop Effector Proteins in the Plant Pathogen *Pseudomonas syringae*. Mol. Plant. Microbe Interact. 18: 275–282.

Mahajan-Miklos S., Tan M., Rahme L. y Ausubel F. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. Cell 96: 47–56.

Malekzadeh R., Derakhshan M. y Malekzadeh Z. 2009. Gastric cancer in Iran: epidemiology and risk factors. Arch. Iran Med. 2009, 12: 576–583.

- Mattar R., Monteiro M., Marques S., Zilberstein B., Hashimoto C. y Carrilho F. 2010.** Association of *lec* and *tnpA* *Helicobacter pylori* genes with gastric cancer in a Brazilian population. *Infect. Agent. Cancer.* 5: 1.
- McLean R., Whiteley M., Stickler D. y Fuqua W. 1997.** Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilm. *FEMS Microbiol. Lett.* 154: 259–263.
- Kim M., Hirono I., Kurokawa K., Maki T., Hawke J., Kondo H., Santos M. y Aoki T. 2008.** Complete DNA Sequence and Analysis of the Transferable Multiple-Drug Resistance Plasmids (R Plasmids) from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* Isolates Collected in Japan and the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 606–611.
- Mougous J., Cuff M., Raunser S., Shen A., Zhou M. y Gifford C. 2006.** A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* 312: 1526–1530.
- Munkvold K., Martin M., Bronstein P. y Collmer A. 2008.** A survey of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III secretion system effector repertoire reveals several effectors that are deleterious when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 490-502.
- Ohman D., Cryz S. y Iglewski B. 1980.** Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mutant than producers altered of elastase. *J. Bacteriol.* 142: 836–842.
- Ortiz-Castro R., Díaz-Perez C., Martínez-Trujillo M., E. del Río R., Campos- García J. y López-Bucio J. 2011.** Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108: 7253-7258.
- Passador L., Cook J., Gambello M., Rust L. y Iglewski B. 1993.** Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260: 1127–1130.
- Pearson J., Passador L., Iglewski B. y Greenberg E. 1995.** A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 1490 – 1494.
- Pesci E. y Iglewski B. 1997.** The chain of command in *Pseudomonas* quorum-sensing. *Trends Microbiol.* 4: 132–134.
- Peters J. y Galloway D. 1990.** Purification and characterization of and active fragment of the LasA protein from *Pseudomonas aeruginosa*: enhancement of elastase activity. *J. Bacteriol.* 172: 2236–2240.

Petnicki-Ocwieja T., Schneider D., Tam V., Chancey S., Shan L., Jamir Y., Schechter L., Janes M., Buell C., Tang X., Collmer A. y Alfano J. 2002. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 7652-7657.

Pitt T. 1989. Lipopolysaccharide and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiot. Chemother. 42: 1-7.

Pritchard A. y Vasil M. 1986. Pseudomonas: molecular biology and biotechnology. J. Bacteriol. 176: 291-298.

Rahme L., Ausubel F., Cao H., Drenkard E., Goumnerov B., Lau G., Mahajan-Miklos S., Plotnikova J., Tan M., Tsongalis J., Walendziewicz C. y Tompkins R. 2000. Plant and animals share functionally virulence factors. Proc. Natl. Acad. Sci. 16: 8815-8821.

Rahme L., Stevens E., Wolfort S., Shao J., Tompkins R. y Ausubel F. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science 268: 1899-1902.

Ramírez-Díaz M., Díaz-Magaña A., Meza-Carmen V., Johnstone L., Cervantes C. y Rensing C. 2011. Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy metal resistance genes. Plasmid 66: 7-18.

Rampioni G., Schuster M., Greenberg E., Bertani I., Grasso M., Venturi V., Zennaro E. y 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.

Rhame F. 1979. Inappropriate federal requirements for air control in hospital isolation rooms. JAMA 242: 1971-2.

Richter A., Povolotsky T., Wieler L. y Hengge R. 2014. Cyclic-di-GMP signalling and biofilm-related properties of the Shiga toxin-producing 2011 German outbreak *Escherichia coli* O104:H4. 6: 1622-37.

Rosqvist R., Hakansson S., Forsberg A. y Wolf-Watz H. 1995. Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of *yersiniae*, *salmonellae*, and *shigellae*. EMBOJ. 14: 4187-4195.

Sato H. y Frank D. 2004. ExoU is a potent intracellular phospholipase. Mol. Microbiol. 53: 1279-1290.

Schmidt H. y Hensel M. 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin. Microbiol. Rev. 17: 14-56.

- Schmidt K., Tummler B. y Romling U. 1996. Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in cystic fibrosis patients and aquatic habitats. *J. Bacteriol.* 178: 85–93.
- Shortridge V., Lazdunski A. y Vasil M. 1992. Osmoprotectan and phosphate regulate expression of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 6: 863–871.
- Sorensen R., Klinger J., Cash H., Chase P. y Dearborn D. 1983. Virulence and Defense in Host-Pathogen Interactions *Infect. Immun.* 41: 321–330.
- Stover C., Pham X., Erwin A., Mizoguchi S., Warrenner P., Hickey M., Brinkman F., Hufnagle W., Kowalik D. y Lagrou M. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964.
- Tan M. y Ausubel F. 2000. *Caenorhabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 29–34.
- Tan M., Mahajan-Miklos S. y Ausubel F. 1999. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 715–720.
- Thanassi D. y Hultgren S. 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 420–430.
- Toder D., Gambello M. y Iglewski B. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of lasR. *Mol. Microbiol.* 5: 2003–2010.
- Toska J., Sun Y., Carbonell D., Foster A., Jacobs M., Pearlman E. y Rietsch A. 2014. Diversity of Virulence Phenotypes among Type III Secretion Negative *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. *PLoS One* 9: e86829
- Vernikos G. y Parkhill J. 2008. Resolving the structural features of genomic islands: a machine learning approach. *Genome Res.* 18: 331–342.
- West S., Schweizer H., Dall C., Sample A. y Runyen-Janecky L. 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 148: 81-86.
- Whitehead N., Barnard A., Slater H., Simpson N. y Salmond G. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 365– 404.

Wiehlmann L., Wagner G., Cramer N., Siebert B., Gudowius P., Morales G., Kohler T., Van Delden C., Weinel C., Slickers P. y Tummeler B. 2007. Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. 104: 8101-6.

Withers H., Swift S. y Williams P. 2001. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. Curr. Opin. Microbiol. 4: 186-193.

Wolfgang M., Kulasekara B. y Liang X. 2003 Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 8484–8489.

Wurdemann D. y Tummeler B. 2007. *in silico* comparison of pKLC102- like genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. 275: 244–249.

Zhao J., Zhang L., Gu Z., Ding Z. y Shi G. 2013. Expression of hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli*. Wei Sheng Wu Xue Bao. 53: 259-68.

Zwiesler-Vollick, J., Plovanich-Jones A., Nomura K., Bandyopadhyay S., Joardar V., Kunkel B. y He S. 2002. Identification of novel hrp-regulated genes through functional genomic analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 genome. Mol. Microbiol. 45: 1207-1218.