

CARACTERIZACION DEL REGULADOR TRANSCRIPCIONAL RhlR DE *Pseudomonas aeruginosa*

Katy Juárez, Gerardo Medina y Gloria Soberón
Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apdo. Post.510-3,
Cuernavaca Morelos. C.P. 62250. Fax 0173172388. katy@ibt.unam.mx

Palabras claves: *quorum sensing*, *DNA-binding*

Introducción: Numerosas bacterias sintetizan moléculas pequeñas y difusibles conocidas como autoinductores que les permiten tener una comunicación célula:célula y coordinar la expresión específica de genes en respuesta a la densidad celular mediante un fenómeno conocido como respuesta sensora de quorum. En *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista de humanos que causa severas infecciones en pacientes inmunocomprometidos o con fibrosis quística, la expresión de numerosos factores de virulencia se encuentra regulada por la respuesta sensora de quorum mediante dos sistemas, el sistema *las* y el sistema *rhl*. Estos dos sistemas están constituidos por un regulador transcripcional, LasR y RhlR, cuya actividad es regulada por la unión de un autoinductor específico, N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona y N-butil homoserina lactona respectivamente, los cuales son sintetizados por LasI y RhlI respectivamente. El sistema Rhl controla la expresión del operon *rhlAB* que codifica para la ramnosiltransferasa requerida en la producción de ramnolípido, que por sus características de biosurfactante presenta una potencial aplicación ambiental en bioremediación (1).

La regulación genética de estos dos sistemas es compleja, existe una jerarquía y una estrecha interrelación entre ellos (2). Sin embargo, aunque el conocimiento de estos sistemas ha ido en aumento recientemente, solo se cuenta con datos a nivel genético y no existen reportes de la interacción de los reguladores transcripcionales con los promotores de los genes que regulan, ni de su interacción con el autoinductor. El interés principal de esta investigación es la caracterización de RhlR a nivel molecular y su interacción con el promotor del operon *rhlAB*. Además de entender como se modula su actividad en respuesta a la concentración y naturaleza del autoinductor.

Metodología. Se llevo a cabo la clonación del gene *rhlR* y la sobreexpresión de la proteína RhlR en *Escherichia coli*. Para facilitar su purificación, la proteína RhlR se fusionó a la proteína de unión a maltosa (MBP). Se realizaron ensayos de "footprinting *in vivo* e *in vitro*" y retardamiento de un fragmento de DNA específico, para determinar la interacción con el promotor de *rhlAB*.

Resultados y Discusión: Los resultados obtenidos en relación a la interacción de RhlR y el promotor del operon *rhlAB* muestran que esta proteína reguladora se une específicamente a una región identificada como el posible

blanco de unión, la cual se dedujo por similitud con otras regiones a las que se unen proteínas de la familia LuxR, a la cual pertenece RhlR. En ensayos de "footprinting *in vivo*" las bases correspondientes a dichas regiones se observan protegidas. Por otro lado se determinó que RhlR es capaz de retardar específicamente un fragmento de 150 pb de DNA que contiene el promotor de el operon *rhlAB*, tanto en presencia como en ausencia del autoinductor, lo cual es inusual en las proteínas de la familia LuxR. Estos y otros datos obtenidos con fusiones *rhlAB::lacZ* nos llevan a pensar que este regulador podría presentar una actividad dual, tanto de represor como de activador, en dependencia de la concentración del autoinductor.

Se sobreexpresó y purificó la proteína de fusión MBP-RhlR, la cual se une al DNA con una menor afinidad que la proteína nativa, esto podría ser un efecto del componente MBP de la fusión, por lo que se eliminará mediante un corte proteolítico y se determinará nuevamente su unión al DNA, así como el efecto del autoinductor en esta interacción.

Conclusiones.

La proteína reguladora RhlR se une a la región blanco predicha por similitud con regiones de unión de proteínas de la familia LuxR.

La proteína reguladora RhlR se une *in vitro* al promotor de *rhlAB* aun en ausencia del autoinductor.

La expresión de una fusión *rhlAB::lacZ* en *E. coli* se incrementa notablemente en la fase preestacionaria, aun en presencia de RhlR desde la fase exponencial.

La proteína de fusión MBP-RhlR se une específicamente al promotor *rhlAB* pero con una menor afinidad que la proteína nativa.

Agradecimientos. El presente trabajo fue apoyado por el CONACyT Proyecto I-35588-N

Bibliografía.

- 1.- Pesci, E., Pearson, J., Seed, P. and Iglewski, B. (1997) Regulation of *las* and *rhl* Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* 179:3127-3132
- 2.- Latifi, A., Foglino, K. Tanaka, K., Williams, P and Lazdunski, A. (1996) A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhlR to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol.Microbiol.* 21(6):1137-1146