



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Modificación genética de cepas ambientales de  
*Pseudomonas aeruginosa* mediante transducción  
generalizada con bacteriófagos**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**JAQUELINE HERSCH GONZÁLEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. LUIS SERVÍN GONZÁLEZ  
2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno  
Hersch  
González  
Jaqueline  
55 28 58 08 88  
Universidad Nacional Autónoma de  
México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
303589677
2. Datos del tutor  
Dr.  
Luis  
Servín  
González
3. Datos del sinodal 1  
Dra.  
Gloria  
Soberón  
Chávez
4. Datos del sinodal 2  
Dra.  
Claudia Andrea  
Segal  
Kischinevzky
5. Datos del sinodal 3  
Dr.  
Jesús  
Ramírez  
Santos
6. Datos del sinodal 4  
M. en C.  
Alejandra Abigail  
González  
Valdez
7. Datos del trabajo escrito  
Modificación genética de cepas ambientales de *Pseudomonas aeruginosa* mediante  
transducción generalizada con bacteriófagos  
69  
2016

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación que me ha dado.

Al Dr. Luis Servín González por su paciencia y enseñanzas para realizar este trabajo, por guiarme y darme la oportunidad de aprender en su laboratorio y por todas sus observaciones y aportaciones.

A la M. en C. Gabriela González Cerón por todo su apoyo, paciencia y recomendaciones en el laboratorio.

A la Dra. Gloria Soberón Chávez por su tiempo, enseñanzas, aportaciones y correcciones durante el desarrollo de este trabajo.

A la M. en C. Abigail González Valdez por tomarse el tiempo de impulsarme a terminar este trabajo, así como por sus observaciones a este escrito.

A la M. en C. Victoria Grosso Becerra por la información sobre el manejo de los bacteriófagos para llevar a cabo lo esencial de este trabajo.

A la Dra. Claudia Andrea Segal Kishinevzky por su tiempo y observaciones a este trabajo escrito para que tuviera una mejor presentación.

Al Dr. Jesús Ramírez Santos por su tiempo y atención a detalles importantes dentro de este escrito.

A la M. en C. Guadalupe Codiz y a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

A Tania, Isaí, Laurita, Manuel, Christian, Dany, Auri, Lalo, Martí, Mauricio y Kevin por la compañía constante en el laboratorio.

A mi abuela Marcela por siempre alentarme a terminar este trabajo.

A Mitzy por estar junto a mí estos últimos años, justo a mi lado. Por creer en mí y siempre darme el apoyo incondicional para seguir y concretar mis metas. Por hacerme disfrutar de esta vida con nuestras risas y aprendizajes. Por saber que ser feliz es lo más importante.

A Yutzil, Lupita y Alfredo por hacerme sentir parte de su familia y por darme un segundo hogar.

A mis padres por darme el amor y las herramientas a lo largo de mi vida que me hacen ser la persona que hoy soy. A mi madre por ser mi cómplice y darme las mejores disputas para aprender juntas de ellas. A mi padre por su paciencia y por entendernos de una manera especial. A mi hermana Pamela (Lupita) por creer siempre en mí y por ser la mejor hermana que me pudo tocar. A mi hermano Jorge (enano) por hacer la vida más interesante al saber que siempre estará.

## DEDICATORIA

*A esta vida, que me ha dado tanto que quise estudiarla.*

## ÍNDICE

<b>Resumen</b>	1
<b>Introducción</b>	2
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
2. Factores de virulencia y su regulación	3
2.1. Principales factores de virulencia	3
2.1.1. Píocianina	3
2.1.2. Exotoxina A	6
2.1.3. Elastasa	7
2.1.4. Ramnolípidos	8
2.2. Regulación de producción de factores de virulencia por “quorum sensing”	10
2.3. Importancia biotecnológica de los ramnolípidos	12
3. Transducción generalizada	14
<b>Antecedentes</b>	16
<b>Justificación</b>	17
<b>Objetivos</b>	18
<b>Materiales y métodos</b>	19
1. Condiciones de cultivo y conservación de cepas	19
2. Transducción generalizada	21
2.1. Ensayos de formación de placas	21
2.2. Transducción generalizada a cepas ambientales	21
3. PCR-targeting	22
3.1. Obtención de fragmentos para transformar la cepa PAO1/pUCP18-RedS	22
3.1.1. Por digestión del plásmido pJQ200mp18	22
3.1.2. Por PCR del plásmido pJQ200mp18	23

3.1.3. Por digestión del plásmido pJQ200mp18 $\Delta$ <i>toxA::aadA1</i> para la obtención de regiones homólogas de aproximadamente 100 pb	24
<b>Resultados y discusión</b>	25
1. Comparación de secuencias de los genes <i>rhIR</i> , <i>rhII</i> , <i>toxA</i> y <i>lasB</i> de la cepa silvestre PAO1 con las cepas ambientales M10, IGB83 e ID4365	25
2. Infección de cepas ambientales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
2.1. Infección por el bacteriófago E79tv-2	27
2.2. Infección por el bacteriófago F116L	28
3. Transducción generalizada en <i>P. aeruginosa</i> mediada por el bacteriófago E79tv-2	29
3.1. Cepa donadora PAO1 $\Delta$ <i>rhIRI::aadA1</i> , cepa receptora PAO1	29
3.2. Cepa donadora PAO1 $\Delta$ <i>rhIRI::aadA1</i> , cepa receptora M10	32
3.3. Cepa donadora PAO1 $\Delta$ <i>rhIRI::aadA1</i> , cepa receptora IGB83	32
4. Transducción generalizada en <i>P. aeruginosa</i> mediada por el bacteriófago F116L	35
4.1. Cepa donadora PAO1 $\Delta$ <i>rhIRI::aadA1</i> , cepa receptora M10	35
4.2. Cepa donadora PAO1 $\Delta$ <i>rhIRI::aadA1</i> , cepa receptora IGB83	38
5. Comprobación de la correcta inserción del <i>cassette aadA1</i> mediante PCR	39
6. Transducción de <i>lasB::TnTc</i> mediada por el bacteriófago F116L	41
6.1. Cepa donadora PW7302, cepas receptoras M10, IGB83 e ID4365	42
7. PCR-targeting	45
7.1. Intentos de interrupción de los genes <i>toxA</i> y <i>lasB</i> de <i>P. aeruginosa</i>	46
7.1.1. Con fragmentos obtenidos por digestión del plásmido pJQ200mp18	46
7.1.2. Con fragmentos obtenidos por PCR del plásmido pJQ200mp18	47
7.1.3. Con fragmentos obtenidos por digestión del plásmido pJQ200mp18 $\Delta$ <i>toxA::aadA1</i> para obtener regiones homólogas de aproximadamente 100 pb	48
<b>Conclusiones</b>	50
<b>Perspectivas</b>	51
<b>Apéndice 1 (medios de cultivo, antibióticos, buffers y reactivos)</b>	52

<b>Apéndice 2 (protocolos)</b>	55
<b>Referencias</b>	65

## RESUMEN

*Pseudomonas aeruginosa* se caracteriza por ser una bacteria patógena oportunista y una de las principales causas de infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos, con fibrosis quística o quemaduras graves. Independientemente de sus implicaciones a nivel clínico, esta bacteria gram negativa se ha vuelto objeto de estudio por llevar a cabo la síntesis de glicolípidos con potenciales aplicaciones biotecnológicas llamados ramnolípidos, cuya producción a nivel industrial ha sido de gran interés en los últimos años.

Como un primer paso para el desarrollo biotecnológico de los ramnolípidos, en este trabajo se buscó obtener cepas de *P. aeruginosa* sin los genes que codifican para los principales factores de virulencia partiendo de aislados ambientales de la misma, para un manejo más seguro.

Se demostró que los bacteriófagos *E79tv-2* y *F116L* son capaces de infectar a las cepas ambientales M10 e IGB83, pero no de infectar a la cepa marina ID4365. También se obtuvo como resultado que la transducción generalizada se puede llevar a cabo de manera exitosa utilizando cepas ambientales de *P. aeruginosa* y no únicamente cepas clínicas.

Por último, se logró la modificación genética de dos de las cepas ambientales utilizadas en este trabajo por medio de transducción generalizada mediada por los bacteriófagos *E79tv-2* y *F116L*, con lo que se obtuvieron las cepas M10 e IGB83 sin los genes de virulencia *rhlR*, *rhlI* y *lasB*.

## INTRODUCCIÓN

### 1. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es una especie de las bacterias gram negativas, perteneciente a la subdivisión  $\gamma$  de las proteobacterias. Se puede encontrar en una gran diversidad de ambientes, debido a la capacidad que tiene para utilizar distintos compuestos orgánicos como nutrientes, lo que ha dado como resultado el que se adapte a diferentes condiciones ambientales (Wolf & Elsässer-Beile, 2009).

Es importante mencionar que tiene la característica de ser un patógeno oportunista, siendo sus posibles hospederos plantas y animales, tanto invertebrados como vertebrados, incluidos los humanos. En el último caso tiene implicaciones muy graves en la salud de pacientes inmunocomprometidos, con quemaduras graves o que padecen de fibrosis quística, desarrollando infecciones como meningitis, septicemia e infecciones crónicas en los pulmones (Wolf & Elsässer-Beile, 2009).

Se trata de una especie resistente a un gran número de antibióticos, ya que su membrana externa funciona como una barrera de permeabilidad; asimismo utiliza estrategias como la inactivación de los antibióticos por medio de enzimas, la modificación de las moléculas diana de acción de los antibióticos y la eliminación de moléculas potencialmente dañinas por medio de bombas de eflujo. Cabe mencionar que el uso extenso de antibióticos, sumado a la presencia de estrategias evolutivas, como mutaciones, ha dado lugar a la emergencia de bacterias resistentes a un mayor número de antibióticos o con nuevos mecanismos de resistencia (Sakharkar *et al.*, 2009).

Es característica de *P. aeruginosa* la producción de un tapete bacteriano o biopelícula durante su crecimiento e infección, misma que tiene como función la protección celular y la comunicación intercelular. La formación de esta biopelícula se lleva a cabo cuando las bacterias detectan cambios ambientales que les lleva a cambiar su forma de vida planctónica por el crecimiento sobre una superficie y así formar microcolonias que funcionan de una manera compleja y coordinada (De Kievit, 2009; Lau *et al.*, 2004).

## 2. Factores de virulencia y su regulación

### 2.1. Principales factores de virulencia

*P. aeruginosa* produce una gran variedad de factores de virulencia, mismos que le han permitido establecer fuertes infecciones en diversos organismos, causar daños tisulares e interferir con el sistema inmune de su hospedero. Algunos de estos factores se encuentran situados en la superficie celular con el fin de poder entrar en contacto directo con sus hospederos, como son los pili, las lectinas, los lipopolisacáridos y polisacáridos. Estos tienen la función de adhesión y colonización del hospedero, principalmente. Otros factores de virulencia son los secretados por la célula, y cumplen con funciones como la diseminación de la colonia bacteriana y el daño a tejidos del organismo hospedero (Wolf & Elsässer-Beile, 2009). Entre los principales factores secretados de virulencia se encuentran proteicos y no proteicos. Las principales proteínas secretadas son la elastasa, la proteasa alcalina, la proteasa LasA, la hemolisina y la exotoxina A. Entre los factores no proteicos están los ramnolípidos y la piocianina (Lau *et al.*, 2004).

#### 2.1.1. Piocianina

La piocianina es un metabolito secundario producido por la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa*, el cual se caracteriza por su coloración azul. Es un compuesto aromático, lo que le da la capacidad de penetrar con facilidad membranas celulares. Diversos estudios han dado como resultado que la intervención de la piocianina es crucial para que se lleve a cabo la infección de *P. aeruginosa*, pero aún no se define con precisión la contribución exacta que ésta tiene. Estudios *in vitro* utilizando piocianina purificada, han mostrado que afecta directamente a las células causando un gran daño celular, siendo algunas de las consecuencias la inhibición de la respiración celular, la afectación en el funcionamiento ciliar y la interrupción del transporte de calcio (O'Malley *et al.*, 2003).

Estudios realizados durante infecciones experimentales en hospederos de distintos orígenes filogenéticos, han arrojado que los mecanismos de virulencia utilizados por *P. aeruginosa* son mecanismos altamente conservados, independientemente de la divergencia evolutiva de sus hospederos, siendo la piocianina uno de estos mecanismos conservados. En el caso específico del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, la piocianina participa en su muerte rápida al producir especies

reactivas de oxígeno. Para algunos organismos como *Drosophila melanogaster*, plantas y ratones, la infección con cepas mutantes de *P. aeruginosa* deficientes en la producción de piocianina se ve atenuada, y es notoria la baja en la mortalidad de los organismos infectados (Lau *et al.*, 2004).

Una de las estrategias directas que afectan el funcionamiento celular es la inactivación del complejo enzimático V-ATPasa, el cual contribuye al consumo y a la síntesis del ATP. Es también un receptor que media la endocitosis y el transporte por medio de vesículas, por lo que resulta esencial para la sinapsis, así como contribuye a la selección de moléculas diana de enzimas lisosomales, al procesamiento y degradación de proteínas y forma parte de la regulación del transporte de moléculas pequeñas. Como consecuencia, el tráfico de proteínas entre distintos compartimentos celulares se ve reducido (Forgac, 2000).

La piocianina reducida al reaccionar con oxígeno molecular ( $O_2$ ) forma especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) que causan un estrés oxidativo en la célula (Müller, 2002). Otro mecanismo de acción de la piocianina es el aumento en la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en las células epiteliales del pulmón, molécula que tiene efectos oxidantes negativos sobre algunos compuestos celulares como las proteínas y lípidos (Mavrodi *et al.*, 2001). El  $H_2O_2$  puede degradarse por medio de la enzima catalasa, cuya función se ve inhibida por la presencia de la piocianina, que actúa directamente reduciendo la transcripción del gen de la catalasa (O'Malley *et al.*, 2003).

El estudio a partir del esputo de pacientes con fibrosis quística ha arrojado que la piocianina en altas concentraciones induce la apoptosis en neutrófilos, macrófagos derivados de monocitos y células epiteliales, siendo distintas las concentraciones mínimas para cada tipo celular (Lau *et al.*, 2004).

Es de importancia señalar que las mitocondrias tienen un papel directo en el ciclo redox de la piocianina, ya que mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* afectadas en procesos respiratorios que involucran a la mitocondria son dañadas en menor proporción que las células con un proceso mitocondrial normal. Las microscopías electrónica y confocal han aportado resultados que corroboran esta hipótesis (O'Malley *et al.*, 2002).

La actividad de la piocianina es dependiente de oxígeno molecular, por lo que la comprensión de cómo se lleva a cabo la infección y daños celulares por la presencia de la misma ha resultado compleja.

Durante la infección de *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística las condiciones en las que se encuentran estas bacterias son anaerobias, y se utilizan como aceptores de electrones el nitrato (NO<sub>3</sub>) o el nitrito (NO<sub>2</sub>). Resulta relevante también que se haya demostrado que la piocianina no puede matar a microorganismos fermentadores, pero precisamente pueden verse afectados los organismos que realizan la reducción del NO<sub>3</sub> en forma anaerobia, como lo son *Staphylococcus* y *Bacillus* spp (Yoon *et al.*, 2002).

Un mecanismo que se ha estudiado para disminuir el daño al organismo durante la infección de *P. aeruginosa* es la inhibición de la producción de piocianina, la cual se sintetiza a partir de la molécula de corismato. Puede resultar conveniente que la interrupción de la síntesis de piocianina se haga desde sus primeras etapas, teniendo en cuenta que varios precursores de esta molécula son también tóxicos para las células eucariontes. En esta vía de síntesis se encuentra también la de producción de aminoácidos aromáticos, la cual es característica de organismos como levaduras, células procariontes en general y hongos filamentosos. Es precisamente en esta ruta donde puede afectarse la producción de piocianina, siendo la interrupción de síntesis del ácido shikímico el primer objetivo, ya que es este ácido el que da lugar a la molécula de corismato (figura 1). La interrupción de la vía de síntesis en este punto también resulta benéfica porque no daña ni interfiere con las funciones de las células eucariontes (Lau *et al.*, 2004).

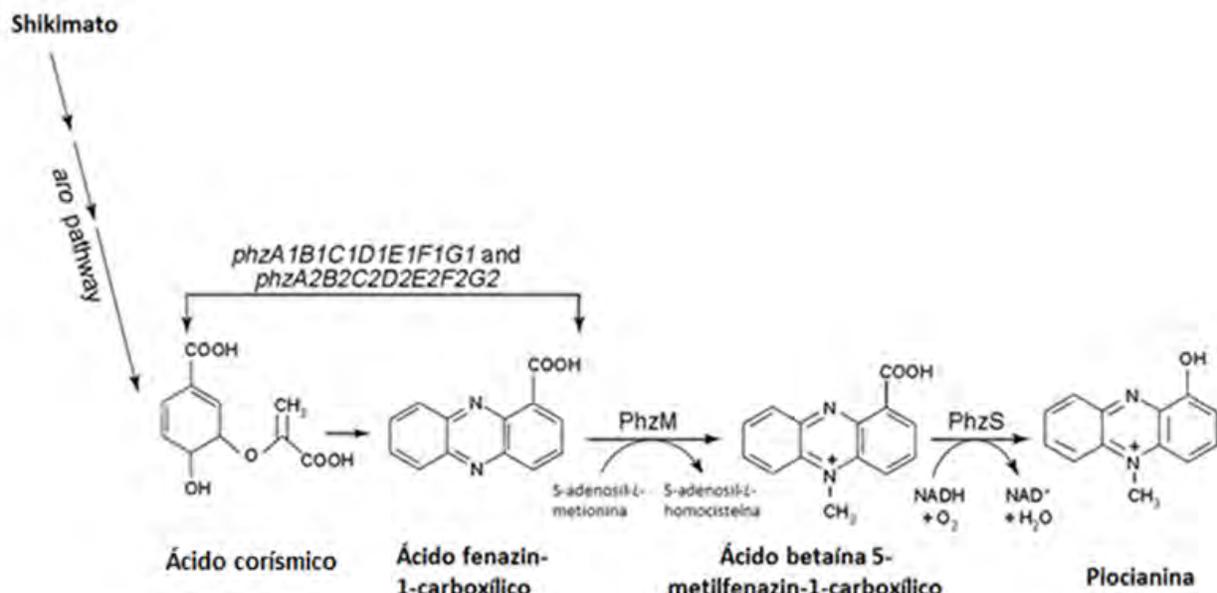


Figura 1. Ruta biosintética de piocianina (modificada a partir de Lau *et al.*, 2004).

### 2.1.2. Exotoxina A

La exotoxina A es considerada como el factor de virulencia más importante, ya que afecta directamente la síntesis de proteínas dentro de las células del organismo hospedero. Esta molécula es un polipéptido compuesto por 613 residuos de aminoácidos con tres dominios funcionales: el primero es el dominio de unión al receptor celular, el segundo el de translocación, y el tercero el de actividad enzimática (figura 2). Es el tercer dominio el que cataliza la inactivación del factor de elongación 2 por medio de ribosilación, con lo cual se inhibe la síntesis de proteínas y tiene como consecuencia la muerte celular (Chaudhary *et al.*, 1990). La apoptosis también es una consecuencia de esta toxina, ya que se induce este proceso por medio de la activación de las caspasas 8 y 3 (Wolf & Elsässer-Beile, 2009).



Figura 2. Dominios de la proteína exotoxina A de *P. aeruginosa* (modificada a partir de Wedekind *et al.*, 2001).

Los primeros estudios sobre esta toxina proponían que ésta era la causa principal de la toxicidad de *P. aeruginosa*. Por esta razón se realizaron varios experimentos en los que se utilizó a la exotoxina A purificada para ver las afecciones directas sobre organismos como ratones y conejos, en los que causó edemas y necrosis en las zonas dañadas, reducción del número de leucocitos y muerte de los organismos entre las 24 y 48 horas (Liu, 1974).

La acción de este tipo de toxinas se caracteriza por hacer modificaciones catalíticas en sustratos específicos en el citosol de las células de los organismos hospederos por medio de la translocación desde el retículo endoplásmico. Las toxinas se unen a las células por medio de receptores que se encuentran en la membrana celular y es por medio de endocitosis que se introducen a la célula (Smith *et al.*, 2006).

La  $\alpha_2$ -macroglobulina/LRP ( $\alpha_2$ MR/LRP) es la proteína de unión de la exotoxina A. Se trata de una glicoproteína superficial presente en varios tipos de tejidos y células, siendo los fibroblastos y

hepatocitos en donde se encuentra en mayor cantidad. La  $\alpha_2$ MR/LRP permite la entrada de la exotoxina A por medio de endocitosis, entrando finalmente un fragmento de 37kDa. Las células que tienen una mayor cantidad de esta proteína de unión son las que se ven expuestas a la entrada y daño por parte de la exotoxina A (Kounnas *et al.*, 1992).

Una posible aplicación que se ha planteado para esta proteína es su utilización para afectar directamente a las células cancerígenas por su potencial citotóxico (Wolf & Elsässer-Beile, 2009).

### **2.1.3. Elastasa**

Purificada y descrita por Morihara *et al.* en 1965, la elastasa es considerada uno de los factores de virulencia más importantes sintetizados por *P. aeruginosa*, ya que provoca daños directamente en los tejidos. Esta proteasa de 23kDa forma parte del grupo de las metaloproteasas, siendo necesario un átomo de zinc para su funcionamiento (Bever & Iglewski, 1988).

Esta proteína es producida por todas las cepas de *P. aeruginosa* estudiadas hasta ahora, teniendo variaciones entre las mismas en la parte cuantitativa. Su síntesis es a partir del gen *lasB*, que codifica para una preproelastasa de 498 residuos de aminoácidos, y una vez madura, la proteína queda conformada por 301 aminoácidos (Thayer *et al.*, 1991).

Es una de las muchas enzimas producidas por *P. aeruginosa* involucradas en las infecciones de esta proteobacteria y tiene la capacidad de degradar moléculas como la elastina y el colágeno e inactivar varios tipos de inmunoglobulinas, particularidad que resalta su importancia como factor de virulencia (Bever & Iglewski, 1988). La elastasa purificada no hidroliza únicamente a la elastina, también hidroliza caseína, hemoglobina, albúmina y fibrina (Morihara *et al.*, 1965).

Tanto la elastólisis como la proteólisis requieren de un pH de 8 para su actividad óptima (Morihara *et al.*, 1965), requiriendo también la actividad elastolítica del producto del gen *lasA*, ya que éste acelera el proceso al llevar a cabo pequeños cortes en la estructura de la elastina (Galloway, 1991). Otra actividad en la que participa la proteína LasA es en el procesamiento final de la elastasa, ampliando su especificidad por el sustrato (Bever & Iglewski, 1988).

Algunas afectaciones directas a tejidos pulmonares tienen como resultado hemorragias alveolares y necrosis de células septales de los alveolos (Wretlind & Pavlovskis, 1983), destruyendo también en gran proporción el tejido pulmonar, el cual se encuentra formado en un 28% por elastina (Galloway, 1991).

#### 2.1.4. Ramnolípidos

La producción de ramnolípidos fue reportada por primera vez en 1949 y fue más de 40 años después que se describió su síntesis en *P. aeruginosa* (Maier & Soberón-Chávez, 2000). Los ramnolípidos son moléculas anfipáticas compuestas por una parte hidrofóbica de ácidos grasos y por una o dos moléculas de ramnosa, la parte hidrofílica. La síntesis de estos biosurfactantes es característica de *P. aeruginosa*, aunque también son producidos por algunas cepas de los géneros *P. putida* y *P. chlororaphis*, y por algunas especies del género *Burkholderia* (Toribio *et al.*, 2010). En la figura 3 se muestra su estructura, la cual se basa en un dímero de ácido 3-(3-hidroxicanoiloxi)alcanóico (HAAs) unido por un enlace  $\beta$ -glucosídico a una molécula de ramnosa (Soberón-Chávez *et al.*, 2005). *P. aeruginosa* es capaz de producir dos tipos de ramnolípidos, los mono y los di-ramnolípidos; estos últimos poseen dos moléculas de ramnosa, las cuales son unidas al HAAs por dos reacciones en secuencia catalizadas por las ramnosiltransferasas RhIB y RhIC (Nitschke *et al.*, 2005).

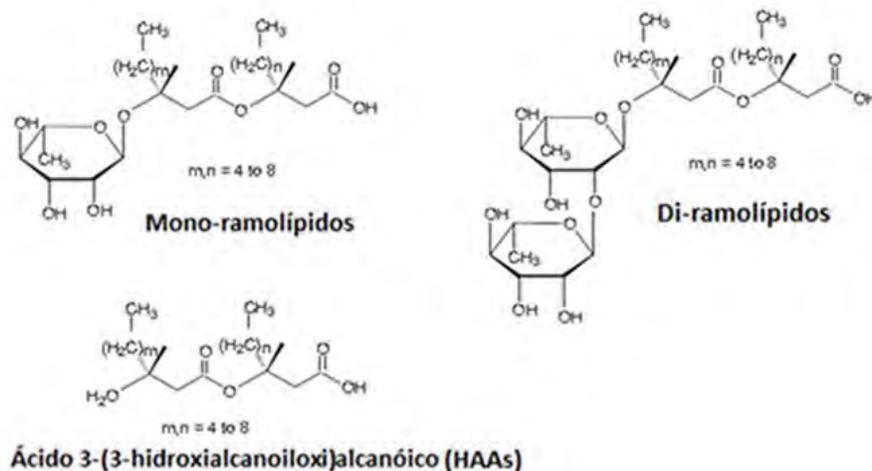


Figura 3. Estructura química de ramnolípidos y HAAs (modificada a partir de Soberón-Chávez *et al.*, 2005).

Aún no está completamente dilucidado el rol fisiológico que desempeñan los ramnolípidos; algunos procesos en los que se ha evidenciado su participación son la asimilación de sustratos insolubles (en especial hidrocarburos), el modificar la hidrofobicidad de la superficie celular, la actividad antimicrobiana y hemolítica, y la movilidad por nado en enjambre o *swarming* (Reis *et al.*, 2011). En cuanto a su participación en la parte estructural de la formación del tapete bacteriano, son parte importante del mantenimiento de canales de transporte de sustancias y de la estructura del tapete mismo (Chrzanowski *et al.*, 2012).

Los di-ramnolípidos en altas concentraciones actúan directamente afectando células del sistema inmunológico y tienen una actividad citolítica sobre macrófagos derivados de monocitos, mientras que en concentraciones más bajas pueden inhibir su fagocitosis (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).

La sobreproducción de ramnolípidos en *P. aeruginosa* está relacionada con la limitación de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, así como con la fase estacionaria de la curva de crecimiento. Una de las propuestas sobre la función de los ramnolípidos está relacionada a la degradación de sustratos insolubles para la obtención de los nutrientes que se encuentran en bajas concentraciones, pero esto tendría como resultado un gasto energético mayor al que podría obtenerse, por lo que es poco probable que ésta sea la función principal de la sobreproducción de este surfactante. Otra propuesta más aceptada está relacionada a la movilidad de las células, ya que por medio del movimiento pueden encontrar un lugar en donde tengan un mejor acceso a los nutrientes necesarios. Se han descrito tres tipos de movilidad en *P. aeruginosa*, la utilización del flagelo para nadar en ambientes acuáticos, el desplazamiento utilizando los pili (tipo IV) para impulsarse (*twitching motility*) y el nado en enjambre o *swarming* (Chrzanowski *et al.*, 2012).

Gran parte del conocimiento que se tiene sobre los ramnolípidos en *P. aeruginosa* es de carácter básico y relacionado con la expresión de factores de virulencia, por lo que aún está en desarrollo el entendimiento completo sobre el control y regulación de su producción a escalas industriales (Reis *et al.*, 2011).

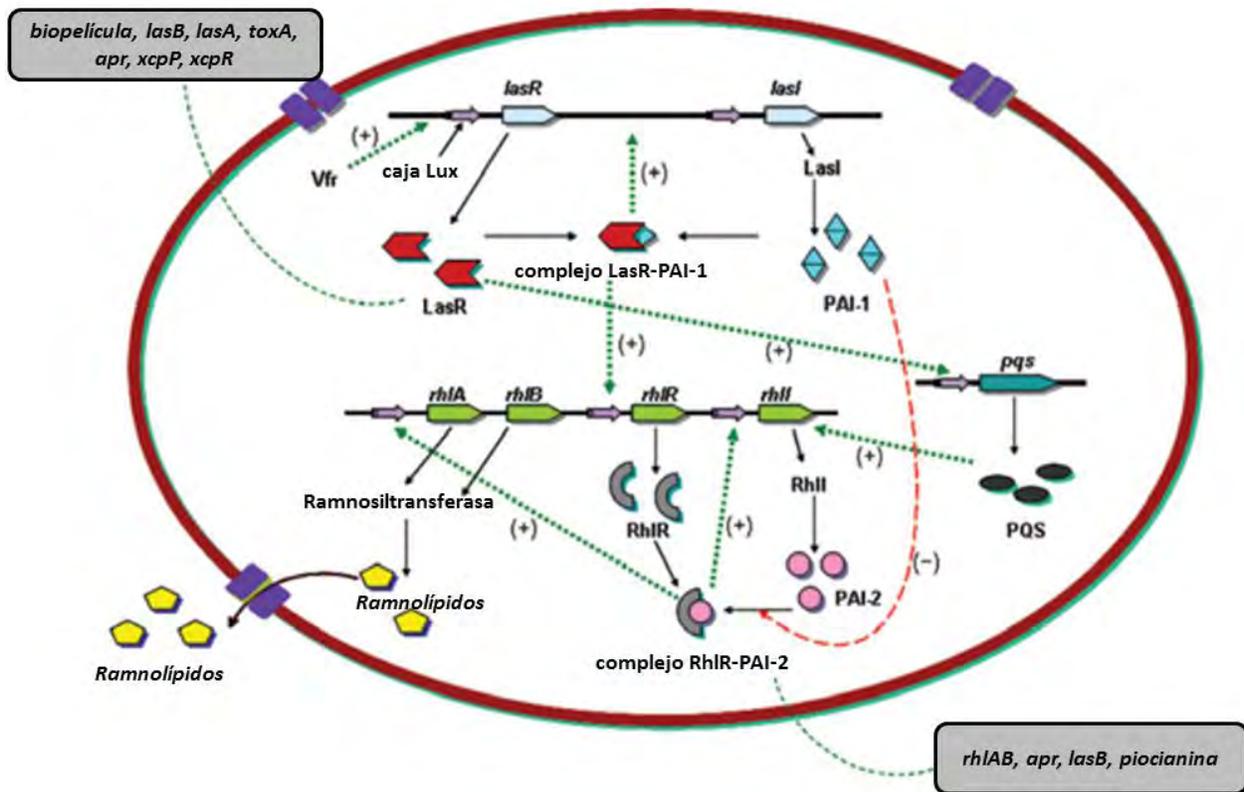
## 2.2. Regulación de producción de factores de virulencia por “quorum sensing”

El “quorum sensing” (QS) o detección del *quorum* es un sistema de comunicación bacteriano que se caracteriza por la producción y detección de moléculas de señalización extracelulares en una población bacteriana, dando como resultado comportamientos coordinados de la población (Reis *et al.*, 2011). Se lleva a cabo por medio de respuestas celulares ante las moléculas de señalización, llamadas autoinductores, que pueden interactuar y activar reguladores transcripcionales específicos cuando la densidad celular traspasa un cierto umbral de concentración (Maier & Soberón-Chávez, 2000). El QS está conformado por tres principios básicos que son (1) la producción celular de autoinductores, (2) la detección de estas moléculas por medio de receptores específicos que se encuentran en la membrana celular o en el citoplasma, y, por último, (3) la activación de la expresión de los genes involucrados, lo cual ocurre una vez que se alcanza el umbral de concentración específico como resultado de altas densidades celulares (Rutherford & Bassler, 2012).

Este proceso de comunicación está involucrado en la regulación de genes en diversas especies bacterianas, en las que regula actividades tan distintas como la bioluminiscencia, la esporulación, la competencia, la producción de antibióticos, la formación del tapete bacteriano y la secreción de factores de virulencia (Rutherford & Bassler, 2012).

Los autoinductores de los sistemas de QS son acil-homoserín-lactonas (acil-HSL), sintetizadas por una sintasa específica a partir de ácidos grasos y homoserina. En *P. aeruginosa* existen dos circuitos de regulación transcripcional mediados por este tipo de autoinductores. El primero es dependiente de la 3-oxo-dodecanoil homoserín lactona (3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL o PAI-1) y el segundo depende de la butanoil homoserín lactona (C<sub>4</sub>-HSL o PAI-2) (Dusane *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2011).

El sistema de regulación *Las* controla al sistema *Rhl* (figura 4) por la organización jerárquica que existe entre ambos sistemas. Esta relación se debe a que el complejo LasR/3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL regula directamente la transcripción del gen *rhIR* y de este modo el sistema LasRI permite la posterior activación del sistema RhlRI (Nadal-Jiménez *et al.*, 2012). Entre un 5 y un 10% de los genes de *P. aeruginosa* están regulados por estos dos sistemas (Reis *et al.*, 2011).



**Figura 4. Representación esquemática de los genes *las* y *rhl* y moléculas de QS para la producción de ramnolípidos en *Pseudomonas aeruginosa*.** El sistema *Las* produce los activadores transcripcionales LasR y LasI (que sintetiza al autoinductor PAI-1). Los genes *rhlA* y *rhlB* forman un operón que está unido a los genes *rhlR* y *rhlI* (que sintetiza al autoinductor PAI-2). Los genes *rhlABRI* dirigen la síntesis de la ramnosiltransferasa y de los activadores transcripcionales RhIR y RhII, que son responsables de la síntesis de ramnolípidos (modificada a partir de Dusane *et al.*, 2010).

La proteína que sintetiza al autoinductor 3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL es la sintasa LasI y el regulador transcripcional que reconoce directamente a este autoinductor es LasR. Este sistema regula la activación de la transcripción de genes que codifican para la síntesis de múltiples factores de virulencia, incluyendo las elastasas LasA y LasB, la exotoxina A y proteasas alcalinas (Nadal-Jiménez *et al.*, 2012).

El sistema *Rhl* produce y responde al autoinductor C<sub>4</sub>-HSL (figura 4), producto de la sintasa RhII, el cual es reconocido por el regulador transcripcional RhIR. De este modo se induce la expresión de los genes *rhlA* y *rhlB*, responsables de la producción de ramnolípidos, y de otros genes relacionados con la producción de piocianina y elastasa, entre otros factores de virulencia (Nadal-Jiménez *et al.*, 2012).

Los genes *rhlA*, *rhlB* y *rhlC* están involucrados en la producción de ramnolípidos; los dos primeros forman el operón *rhlAB*, inducido por RhIR/C<sub>4</sub>-HSL. *RhlA* sintetiza la parte hidrofóbica de los

ramnolípidos y es el que libera las moléculas de HAAs, que se encuentran enlazadas en la parte interna de la membrana celular. La ramnosiltransferasa, producto del gen RhIB, cataliza la transferencia de las moléculas de L-ramnosa de la dTDP-ramnosa hacia los HAAs, formando así los mono-ramnolípidos (figura 5). RhIC es responsable de la adición de una segunda molécula de ramnosa, que da como resultado a los di-ramnolípidos (Chrzanowski et al., 2012; Soberón-Chávez et al., 2005).

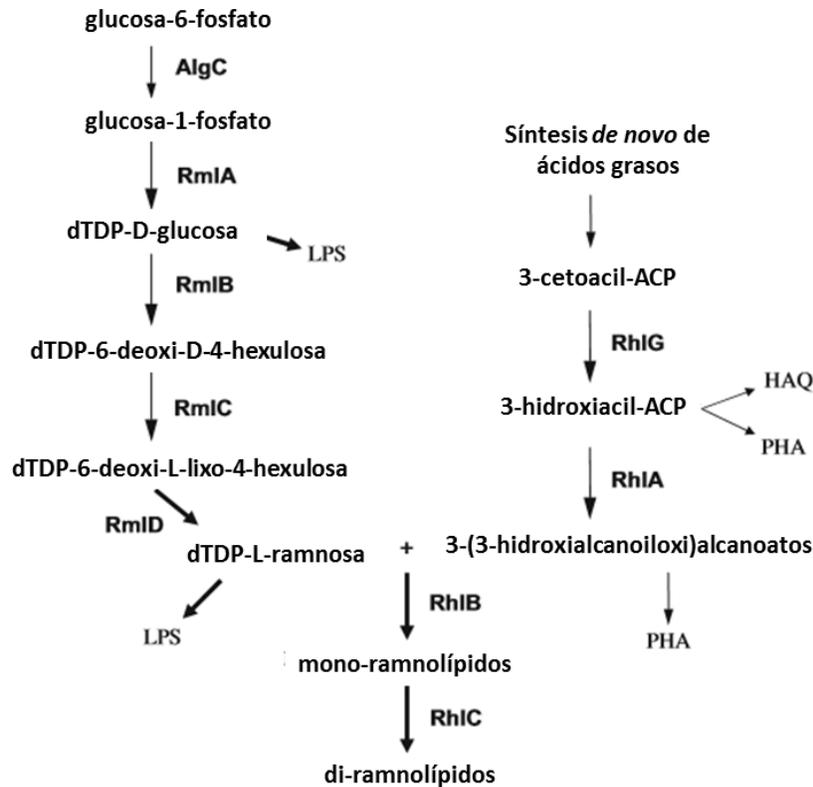


Figura 5. Ruta metabólica para la biosíntesis de los ramnolípidos en *P. aeruginosa* (modificada a partir de Soberón-Chávez et al., 2005).

### 2.3. Importancia biotecnológica de los ramnolípidos

Los ramnolípidos de *P. aeruginosa* son los surfactantes glicolípidos mejor conocidos y estudiados, sus posibles aplicaciones son variadas, desde productos industriales hasta biorremediación (Nitschke et al., 2011). Algunas de las utilidades que se han propuesto a nivel industrial son la producción de químicos de calidad, aditivos para la remediación ambiental, o bien, como agentes de control biológico (Soberón-Chávez, 2005). Las características más importantes y sobresalientes están asociadas con la característica

de ser una molécula anfipática, lo cual les da la capacidad de acumularse entre distintas fases de fluidos y de reducir la tensión superficial (Nitschke *et al.*, 2011).

Para el año 2000 la industria de surfactantes ya excedía los nueve mil millones de dólares por año, siendo actualmente la mayoría de origen sintético. El hecho de que los surfactantes de origen microbiano sean biodegradables y menos tóxicos ha hecho que la producción de éstos haya incrementado su importancia y estudio. Son precisamente los ramnolípidos en los que se ha invertido mayor cantidad de recursos para su estudio de entre todos los surfactantes producidos por bacterias (Maier & Soberón-Chávez, 2000).

En industrias como la cosmética y del cuidado de la salud se utilizan en grandes cantidades para productos como repelentes de insectos, antiácidos, productos contra el acné, productos anti-caspa, soluciones para lentes de contacto, tintes de cabello, pastas de dientes, anti-transpirantes, lubricantes, productos para bebés, antisépticos, productos de rasurado y depilado y cremas hidratantes (Maier & Soberón-Chávez, 2000). En industrias de alimentos han sido aprobados para utilizarse como conservadores por la administración federal de fármacos (FDA) de Estados Unidos por su baja toxicidad en mamíferos y por ser considerado un agente no mutagénico; por ello su uso directo en vegetales, legumbres y cosechas frutales es una buena opción (Nitschke *et al.*, 2011).

La variedad de usos ambientales que se les puede dar es uno de los mayores mercados para los ramnolípidos. Estos pueden utilizarse para biorremediación de suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos, metales pesados y derrames de petróleo. También se ha observado que pueden utilizarse como control de algunos organismos patógenos zoospóricos de plantas, como *Phytophthora cryptogea* y *Pythium* spp. y que por lo mismo pueden contener algún tipo de biofungicida. Por esta razón se puede tener una aplicación para prevenir la contaminación de cosechas por organismos patógenos, como los hongos zoospóricos (Nitschke *et al.*, 2011).

A pesar de que pueden ser producidos en niveles altos, a nivel industrial no ha resultado ser suficiente, por lo que todas estas aplicaciones se pueden ver restringidas. Müller y Hausmann (2011) han propuesto tres estrategias para la mejora de la producción de los ramnolípidos. La primera de estas es realizar alteraciones genéticas teniendo como objetivo inhibir la síntesis de productos no deseados como toxinas, o bien incrementar la producción de ramnolípidos mediante modificación. La segunda

propuesta es utilizar estrategias de bioingeniería. Y, por último, puede buscarse evadir la red de regulación de QS y con esto la síntesis de factores de virulencia (Müller & Hausmann, 2011).

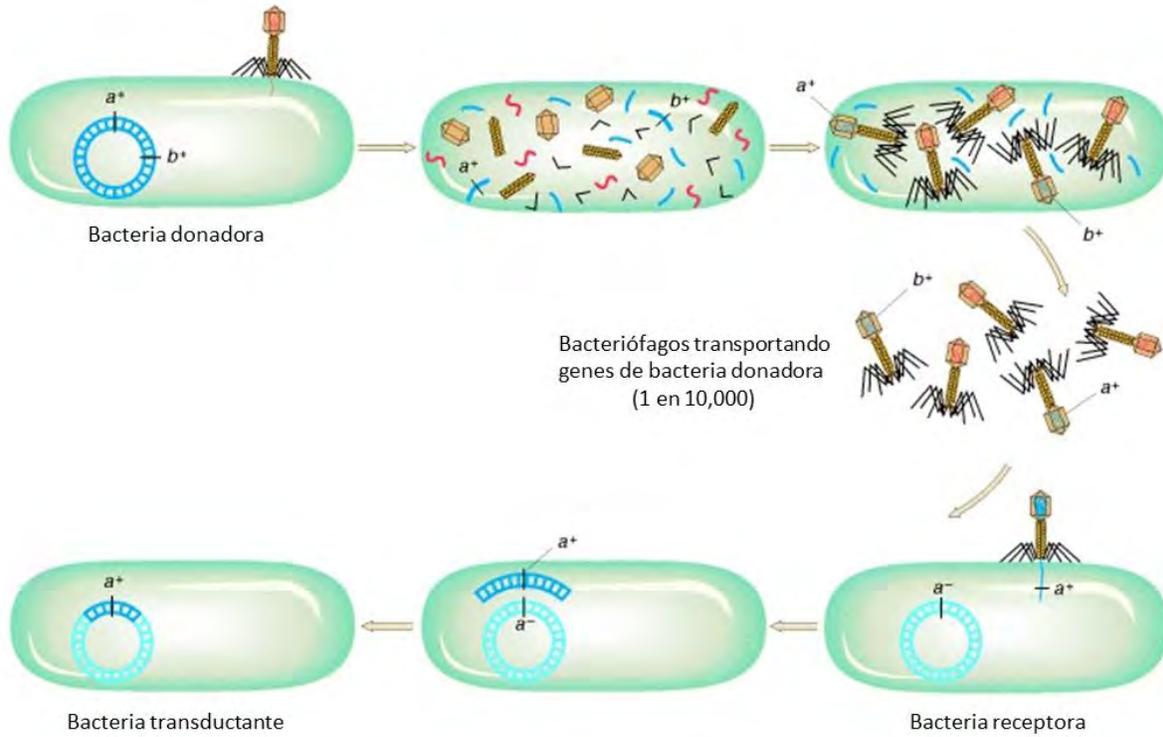
### 3. Transducción generalizada

Descubierta en 1951 por Joshua Lederberg y Norton Zinder (Griffiths *et al.*, 2000), la transducción es una de las diversas formas de transferencia de genes en bacterias. Se lleva a cabo con la participación de un bacteriófago que tenga la capacidad de transportar material genético de una célula bacteriana a otra, llevándolo dentro de la cápside en lugar de su propio material genético.

La transducción se lleva a cabo cuando un bacteriófago introduce a su cápside un fragmento de DNA procedente del genoma de la célula bacteriana infectada durante su ciclo lítico y lo inyecta en otra célula durante una nueva infección. Se han descrito dos tipos de transducción: (1) la generalizada, en la cual se puede empaquetar en la cápside cualquier fragmento de DNA del cromosoma bacteriano, y (2) la especializada, en la que los bacteriófagos lisogénicos pueden acarrear únicamente partes restringidas del cromosoma adyacentes a su sitio de integración en el cromosoma.

Ikeda y Tomizawa (1965) describieron el proceso de transducción generalizada en *Escherichia coli* mediante el bacteriófago P1, en el que el cromosoma bacteriano se divide en fragmentos pequeños y el fago incorpora alguno de éstos en la cápside en lugar de su DNA propio (figura 6). El bacteriófago tiene el sitio de reconocimiento y unión a la célula bacteriana en su cápside proteica, por lo que la infección a una nueva célula no se ve alterada por el DNA que lleve en su interior.

Los genes bacterianos inyectados a la bacteria receptora pueden ser incorporados al DNA por recombinación cuando exista una situación merodiploide, es decir cuando haya identidad del fragmento con una región del genoma de la célula infectada.



**Figura 6. Transducción generalizada** (modificada a partir de Griffiths *et al.*, 2000).

## ANTECEDENTES

Los distintos factores de virulencia que caracterizan a *P. aeruginosa* son responsables de infecciones nosocomiales, principalmente en el tracto respiratorio de pacientes inmunocomprometidos, con quemaduras graves o con fibrosis quística. Esta bacteria gram negativa es un patógeno oportunista y tiene una gran versatilidad ambiental (Kwon & Lu, 2006), por lo que es fácil encontrarla y aislarla de diversos ambientes.

Se han descrito diversos bacteriófagos que infectan a *P. aeruginosa* y que son capaces de llevar a cabo transducción generalizada (Holloway *et al.*, 1961), por lo que se han utilizado como herramientas para el estudio genómico de esta bacteria. La transducción generalizada se ha llevado a cabo utilizando como donadora y receptora a la misma cepa (Morgan, 1979; Morrison *et al.*, 1979), o bien entre las cepas clínicas PAO1 y PA14 (Budzik *et al.*, 2004) y se han empleado marcadores de resistencia a antibióticos para ser transducidos.

Existen múltiples técnicas para inactivar genes en bacterias, las cuales se han desarrollado con el propósito de estudiar sus funciones. Una de las técnicas consiste en utilizar el sistema de recombinación Red del bacteriófago lambda clonado en un plásmido para poder introducirlo a las células. En este sistema se introduce un fragmento de DNA compuesto por un *cassette* de resistencia a algún antibiótico flanqueado por regiones homólogas al gen de interés. En *P. aeruginosa* PA14 se ha modificado utilizando regiones homólogas de entre 600 y 100 nucleótidos de longitud (Lesic & Rahme, 2008).

## JUSTIFICACIÓN

La producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* ha sido objeto de estudio de muchos autores por sus potenciales aplicaciones biotecnológicas (Maier & Soberón-Chávez, 2000; Nitschke *et al.*, 2005). Se ha desarrollado un gran interés en su producción a gran escala, teniendo como inconveniente su patogenicidad. Por esta razón inactivar los genes que hacen a esta bacteria virulenta es un primer paso para la producción segura de este biosurfactante a partir de aislados no clínicos de *P. aeruginosa*.

Al tratarse de una bacteria patógena oportunista es de gran importancia que la utilización de sus productos a nivel industrial se pueda hacer con la mayor seguridad posible, tratándose de la salud de las personas que puedan ser afectadas. A esto se debe que se utilicen cepas aisladas directamente del ambiente, y no cepas clínicas, para eliminar los genes que causan su virulencia con el fin de utilizarlas para la producción a nivel industrial de los ramnolípidos.

Con el desarrollo de este trabajo se puede tener un antecedente para el manejo de cepas de *P. aeruginosa* sin genes de virulencia con el fin de utilizarlas en el área biotecnológica. La transducción generalizada empleando aislados ambientales como cepas receptoras puede brindar una manera más segura de utilizar este conocido patógeno oportunista dentro de otras áreas de investigación, aparte de la relacionada con la salud.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Obtener cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sin genes de virulencia a partir de aislados ambientales por medio de manipulación genética.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la similitud a nivel genómico entre la cepa PAO1 y las cepas ambientales, en las regiones correspondientes a genes de virulencia.
- Demostrar la capacidad infectiva de los fagos E79tv-2 y F116L sobre cepas ambientales de *P. aeruginosa*.
- Demostrar la capacidad de realizar transducción generalizada utilizando cepas ambientales de *P. aeruginosa* como receptoras.
- Eliminar genes de virulencia en cepas ambientales de *P. aeruginosa*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Condiciones de cultivo y conservación de cepas

Las cepas bacterianas utilizadas se enlistan en la tabla 1. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ambientales (M10, IGB83 e ID4365) se incubaron a una temperatura de 30°C, mientras que la cepa clínica (PAO1) a 37°C. Las cuatro cepas se crecieron en los medios de cultivo líquido YT2X, LB, PPGAS y SOB según fuera el caso, todos suplementados con el antibiótico que se requiriera. Las cepas de *Escherichia coli* se incubaron a 37°C en medio líquido YT2X o LB.

Para la conservación de las cepas de *P. aeruginosa* a corto plazo (hasta 5 días) se mantuvieron como colonias aisladas a 4°C en medio con agar al 1.5% con su respectivo antibiótico. Para la conservación a largo plazo se almacenaron a -70°C en glicerol al 20% (v/v). En el caso de *Escherichia coli* se almacenaron a 4°C en medio con agar al 1.5% hasta por un mes, y a largo plazo a -70°C en glicerol al 20%. Los bacteriófagos se conservaron en buffer TMN a una temperatura de 4°C.

**Tabla 1. Cepas utilizadas en el presente trabajo.**

Cepa	Genotipo o características relevantes	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Cepa silvestre, aislado clínico.	Stover <i>et al.</i> , 2000
M10	Cepa silvestre procedente de Cuatro Ciénegas, Coahuila.	Grosso-Becerra <i>et al.</i> , 2014
IGB83	Cepa silvestre, aislada de la selva de Chiapas como altamente lipolítica.	Martínez y Soberón-Chávez, 2001
ID4365	Cepa silvestre de origen marino, aislada cerca de Goa, India. Alta producción de piocianina.	Manwar <i>et al.</i> , 2003
PAO1 $\Delta$ rhIRI::aadA1	No produce piocianina, Sm <sup>R</sup>	Este trabajo
PW7302	PAO1 <i>lasB</i> :: <i>TnTc</i> mutante por inserción de un transposón, Tc <sup>R</sup> , disminución de proteólisis.	Jacobs <i>et al.</i> , 2003
<i>Escherichia coli</i>		
IBEC58	<i>lac</i> <sup>R</sup> <i>rrnB</i> <sub>T14</sub> $\Delta$ <i>lacZ</i> <sub>WJ16</sub> <i>hsdR514</i> $\Delta$ <i>araBAD</i> <sub>AH33</sub> $\Delta$ <i>rhaBAD</i> <sub>LD78</sub> $\Delta$ <i>dam</i> $\Delta$ <i>dcm</i> $\Delta$ <i>hsdRMS</i>	González-Cerón <i>et al.</i> , 2009
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR</i> $\lambda$ ( $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15)	Grant <i>et al.</i> , 1990

**Tabla 2. Bacteriófagos y plásmidos utilizados en el presente trabajo.**

Bacteriófago	Características relevantes	Referencia
E79tv-2	Capaz de llevar a cabo transducción generalizada.	Morgan, 1979
F116L	Capaz de llevar a cabo transducción generalizada.	Krishnapillai, 1971
Plásmido		
pJQ200mp18	Vector de clonación, plásmido suicida en <i>Pseudomonas</i> .	Quandt & Hynes, 1993
pUCP18-RedS	Vector de clonación, con operón lambda Red, con gen <i>sacB</i> y gen <i>bla</i> .	Lesic & Rahme, 2008
pBluescript II SK	Vector de clonación, alto número de copias.	Agilent Technologies

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo.**

Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de restricción
rhIRI-UP	AGCATGCGGCAGGAGAAG	---
rhIRI-DOWN	CTGCTGTGATGCATTTTATCG	---
Hah-138	CGGGTGCAGTAATATCGCCCT	---
LasBFw	CATTCCTTCTGGAGTGCC	---
LasBRv	ACATCGCCCAACTGGTCTAC	---
Oligos universales PUC		
toxA1	CCAGAGCTCAACAGCACGCCGATACC	<i>SacI</i> GAGCT/C
toxA2	CCATTGGATCCGCGGAGGACCTGAAGTA	<i>BamHI</i> G/GATCC
toxA3	TCGCGCGGATCCAATGGGGTGTCAGGT	<i>BamHI</i> G/GATCC
toxA4	GTGTCTAGACAAAGCCACGCTGATTG	<i>XbaI</i> T/CTAGA
lasB1	TGGAGAGCTCGCGAGAGGAACTGATGCAA	<i>SstI</i> GAGCT/C
lasB2	CGATCATGGATCCCGCAGAACCGCAACTACTC	<i>BamHI</i> G/GATCC
lasB3	TCTGCGGGATCCATGATCGCAACGAACAACAG	<i>BamHI</i> G/GATCC
lasB4	TGGGCTGCAGGCTGCCGACTATCGTTG	<i>PstI</i> CTGCA/G

## **2. Transducción generalizada**

### **2.1. Ensayos de formación de placas**

Se realizaron ensayos de formación de placas para determinar la capacidad de infección de los bacteriófagos E79tv-2 y F116L hacia las cepas PAO1, M10, IGB83 e ID4365 de *P. aeruginosa*. Se mezclaron diluciones de los bacteriófagos con células concentradas y se incubaron por 20 minutos, a 37°C la cepa clínica PAO1 y a 30°C las cepas ambientales M10, IGB83 e ID4365. Por último se incorporó agar suave a cada uno de los tubos para inocular la mezcla en cajas con medio nutritivo (ver apéndice 2).

Las placas de lisis fueron observables en las cajas incubadas a la temperatura correspondiente por 12 horas. Se determinó la capacidad de infección por el tamaño, número y nitidez de las placas observadas, así como la dilución conveniente del fago para que se lleve a cabo la infección.

### **2.2. Transducción generalizada a cepas ambientales**

Se prepararon “stocks” o lisados con alto título del bacteriófago correspondiente mediante dos ciclos de propagación en la cepa donadora. Se realizaron distintas diluciones de los lisados para mezclarlas durante 20 minutos con células de la cepa receptora. Posteriormente se lavaron las células para hacer diluciones de las mismas y así plaquearlas en cajas de medio selectivo con agar al 1.5% suplementadas con el antibiótico requerido (ver apéndice 2). Cuando se empleó la cepa PAO1 $\Delta$ rhIRI::aadA1 como donadora se utilizó el antibiótico estreptomicina (200  $\mu$ g/mL). En el caso de la cepa PW7302 como donadora el antibiótico utilizado fue tetraciclina (10  $\mu$ g/mL).

Las colonias obtenidas en las cajas de medio sólido se estriaron en cajas con medios de cultivo específicos para la caracterización del fenotipo transductante. En el caso de la cepa PAO1 $\Delta$ rhIRI::aadA1 el medio para diferenciación y selección de colonias con la mutación presente fue el King A, característico para estimular la producción de pigmentos. Se verificó la capacidad de producción de piodianina por medio de su extracción con cloroformo, para lo cual se crecieron 75 mL de cultivo en medio PPGAS por 48 horas, el cual se centrifugó (7,500 rpm por 10 minutos), se recuperó el sobrenadante y éste se extrajo con 1 mL de cloroformo.

Para la selección de colonias obtenidas de la transducción con la cepa PW7302 se utilizó el medio de cultivo PY agar 1.5% suplementado con leche al 1%, en el que se inoculó 1 µL de cultivo de la cepa correspondiente y se incubó por 24 horas con el fin de comparar la actividad proteolítica de las cepas mediante la observación y comparación de halos en el medio de cultivo (ver apéndice 1).

En todos los casos la mutación se comprobó por medio de PCR (ver apéndice 2) con los oligonucleótidos correspondientes. Para las cepas obtenidas de la transducción con PAO1 $\Delta$ *rhIRI::aadA1* como cepa donadora se utilizaron los oligonucleótidos *rhIRI-UP/rhIRI-DOWN*. En el caso de la cepa PW7302 los oligonucleótidos utilizados fueron *PhoA/LasBRv*. Los fragmentos amplificados por PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1% para su análisis y comparación.

Las mutaciones se comprobaron también por secuenciación de los fragmentos correspondientes en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

### **3. PCR-targeting**

Se introdujo por electroporación el plásmido pUCP18-RedS en la cepa PAO1 (ver apéndice 2). Las bacterias transformadas se seleccionaron por su resistencia al antibiótico carbenicilina (200 µg/ mL) en cajas de medio LB con agar al 1.5%. Se comprobó la correcta introducción del plásmido por sensibilidad a sacarosa al cultivarla en cajas de medio LB adicionado con sacarosa al 10% y se conservaron almacenadas a -70°C en glicerol al 20% (v/v).

#### **3.1. Obtención de fragmentos para transformar la cepa PAO1/pUCP18-RedS**

##### **3.1.1. Por digestión del plásmido pJQ200mp18**

Los plásmidos pJQ200mp18 $\Delta$ *toxA::aadA1* (con resistencia a estreptomycin) y pJQ200mp18 $\Delta$ *lasB::Apra* (con resistencia a apramicina) contienen un fragmento compuesto por un *cassette* de antibiótico flanqueado por regiones de aproximadamente 500 pb, homólogas a las regiones contiguas de los genes *toxA* y *lasB* respectivamente, de *P. aeruginosa* (ver figura 26).

Los plásmidos pJQ200mp18 $\Delta$ toxA::aadA1 y pJQ200mp18 $\Delta$ lasB::Apra se introdujeron por electroporación a la cepa *E. coli* IBEC58, con el fin de obtener DNA no metilado y de esta forma aumentar la eficacia de transformación al ser introducido en *P. aeruginosa*. Las cepas transformadas de *E. coli* IBEC58 se seleccionaron en cajas de medio LB con gentamicina (15  $\mu$ g/ mL), resistencia que les confiere el plásmido pJQ200mp18 y se conservaron a -70°C en glicerol al 20% (v/v).

Se realizó el protocolo de extracción de DNA plasmídico para llevar a cabo la digestión de los dos plásmidos, (1) pJQ200mp18 $\Delta$ toxA::aadA1 en los sitios de restricción *SacI-XbaI*, y (2) pJQ200mp18 $\Delta$ lasB::Apra en los sitios de restricción de *EcoRI*. La digestión de los plásmidos se verificó por el patrón de bandas observado en un gel de agarosa al 1% (ver apéndice 2).

Después de recuperar los fragmentos de restricción por precipitación, se utilizaron para transformar a la cepa PAO1/pUCP18-RedS por electroporación (ver apéndice 2), previamente inducida con L-arabinosa (0.2%) por 1.5 horas para la expresión de las proteínas Red. Las colonias transformadas se seleccionaron por su crecimiento en cajas de medio LB con apramicina (50  $\mu$ g/ mL) y posteriormente se verificó la presencia del fragmento electroporado por medio de PCR, utilizando los oligonucleótidos *lasB1/lasB4*.

### 3.1.2. Por PCR del plásmido pJQ200mp18

Se realizaron reacciones de restricción de los plásmidos pJQ200mp18 $\Delta$ toxA::aadA1 y pJQ200mp18 $\Delta$ lasB::Apra con las enzimas *SacI-XbaI* y *HindIII* respectivamente. Se recuperaron los fragmentos de restricción compuestos por el *cassette* de antibiótico flanqueado por las regiones homólogas de los genes *toxA* y *lasB*. Los fragmentos recuperados se amplificaron por PCR utilizando los conjuntos de oligonucleótidos *toxA1/toxA4* y *lasB1/lasB4* y se realizó el corrimiento de los mismos en un gel de agarosa al 1% para cuantificarlos y corroborar sus tamaños.

Posteriormente se insertaron por electroporación en la cepa PAO1/pUCP18-RedS previamente inducida con L-arabinosa (0.2%) por 1.5 y 2.5 horas. Se seleccionaron las colonias transformadas por su crecimiento en cajas de medio nutritivo con estreptomycin (200  $\mu$ g/ mL) y apramicina (50  $\mu$ g/ mL) respectivamente. La correcta inserción de los fragmentos se verificó por PCR, utilizando los oligonucleótidos *toxA1/toxA4* y *lasB1/lasB4*, según fuera el caso.

### **3.1.3. Por digestión del plásmido pJQ200mp18ΔtoxA::aadA1 para la obtención de regiones homólogas de aproximadamente 100 pb**

Con el fin de obtener un fragmento compuesto por el *cassette* de estreptomicina flanqueado por regiones homólogas de aproximadamente 100 pb, se realizó una digestión del plásmido pJQ200mp18ΔtoxA::aadA1 con las enzimas *EcoRI-EcoRV* dando como resultado un fragmento de 1,976 pb. Este se introdujo en el plásmido pBluescript II SK, digerido con las mismas enzimas, mediante una reacción de ligación, con el fin de obtener un alto número de copias al introducirlo en una cepa hospedera. El plásmido clonado se insertó por transformación en la cepa DH5α de *E. coli* y se seleccionaron las colonias que incorporaron el plásmido con el inserto por su coloración blanca al crecer en cajas con medio LB con ampicilina (200 µg/ mL), IPTG (100mM) y X-Gal (40 µg/ mL).

Se realizó la extracción de DNA plasmídico de un cultivo líquido en medio LB con ampicilina, posteriormente se llevó a cabo la digestión del DNA en los sitios de restricción *EcoRI-EcoRV* y se corrió un gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0.6% para extraer la banda correspondiente al fragmento de 1,976 pb (protocolo de purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa LMP, ver apéndice 2).

Se realizaron dos transformaciones de la cepa PAO1/pUCP18-RedS por medio de electroporación para insertar (1) el fragmento de 1,976 pb purificado del gel de agarosa LMP y (2) el fragmento precipitado directamente de la digestión previa. La cepa PAO1/pUCP18Red-S fue previamente inducida con L-arabinosa (0.2%) por 1.5 y 2.5 horas y las células fueron cultivadas en cajas de medio LB agar 1.5% con estreptomicina (200 µg/ mL) y L-arabinosa (0.2%).

Se llevó a cabo la extracción del DNA cromosomal de un cultivo líquido de medio SOB con estreptomicina (200 µg/ mL) y se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos *toxA1/toxA4*. Se comprobó la inserción del fragmento electroporado por patrón de restricción del DNA digerido con la enzima *BamHI*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Comparación de secuencias de los genes *rhIR*, *rhII*, *toxA* y *lasB* de la cepa silvestre PAO1 con las cepas ambientales M10, IGB83 e ID4365

En la transducción generalizada se lleva a cabo el intercambio de material genético entre una célula donadora y una receptora por medio de un bacteriófago. Durante el ciclo lítico del bacteriófago, fragmentos de DNA de la bacteria hospedera quedan dentro de cápsides de algunos virus recién formados, de esta forma el DNA es transportado por los mismos hacia nuevas bacterias hospederas. Una vez que el bacteriófago que transporta el DNA de la primera bacteria concreta la infección a la bacteria receptora, el material genético puede recombinarse con el cromosoma bacteriano si existen regiones de identidad entre ambos.

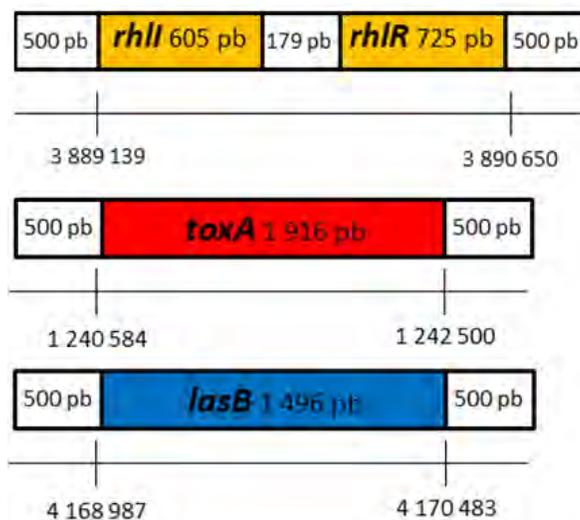


Figura 6. Representación de las regiones de los genes *rhIR*, *rhII*, *toxA* y *lasB* en el genoma de *P. aeruginosa*.

Para las mutaciones realizadas en este trabajo las zonas contiguas a los genes de interés son las que deben presentar identidad entre los genomas de las cepas de bacterias donadoras y receptoras. En la figura 6 se puede observar la representación de las regiones del genoma de *P. aeruginosa* PAO1 en donde se ubican los genes de interés y sus distintos tamaños. Para verificar la identidad entre la cepa donadora y las receptoras se realizaron comparaciones mediante BLAST de los genes *rhIR*, *rhII*, *lasB* y *toxA* de la cepa PAO1, incluyendo regiones contiguas de 500 pb, con las secuencias de los contigs en

donde se encuentran preliminarmente ensamblados los genomas de las cepas M10, IGB83 e ID4365 en la base de datos de *Pseudomonas* Genome Database (Winsor *et al.*, 2011) (tabla 4).

**Tabla 4. Comparación entre la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* y las cepas ambientales de los genes de interés (Winsor *et al.*, 2011).**

Gen	Cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Contig	Bases alineadas	% de identidad	Valor E	Huecos/ Disparidades
<i>rhIRI</i>	M10	contig_339	2 512	100	0	0/ 0
	IGB83	contig_9	2 512	99.08	0	1/ 22
	ID4365	contig_17	2 512	99.24	0	0/ 19
<i>toxA</i>	M10	contig_355	2 917	99.93	0	0/ 2
	IGB83	contig_2	2 917	99.52	0	0/ 14
	ID4365	contig_21	2 585	98.92	0	1/ 19
<i>lasB</i>	M10	contig_103	2 497	100.00	0	0/ 0
	IGB83	contig_1	2 497	99.72	0	1/ 6
	ID4365	contig_5	2 497	98.56	0	0/ 36

Una vez realizada la comparación de las regiones de los genes *rhIR*, *rhII*, *toxA* y *lasB* (incluyendo zonas contiguas), se observó la mayor identidad entre la cepa PAO1 y la cepa M10, siendo del 100% con los genes *rhIRI* y *lasB*, y del 99.93%, la siguiente más elevada, con el gen *toxA*. Entre las cepas PAO1 e IGB83 los porcentajes de identidad de los tres genes son mayores al 99%, siendo en la región de los genes *rhIRI* la más baja. La cepa ID4365 muestra los porcentajes de identidad más bajos de los genes *toxA* y *lasB*, teniendo en éste último 36 disparidades. A pesar de que se muestran distintos porcentajes de identidad entre las comparaciones con las tres cepas, en todas se muestra un valor E de cero, lo que es evidencia de un alineamiento significativo en todos los casos.

La longitud de las regiones del genoma que se pretenden transducir en este trabajo debe ser similar o menor a la del genoma del bacteriófago, ya que de esta forma le es posible transportar los fragmentos de dichas regiones dentro de su cápside. La longitud de los fragmentos utilizados en este trabajo varía entre las 1,400 pb y 4,500 pb, por lo que en teoría se deben poder empaquetar en las cápsides de los bacteriófagos *E79tv-2* o *F116L*.

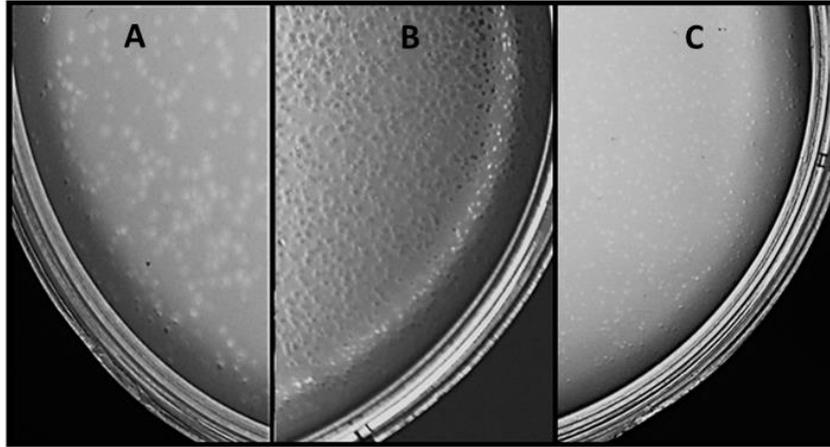
## 2. Infección de cepas ambientales de *Pseudomonas aeruginosa*

### 2.1. Infección por el bacteriófago E79tv-2

El bacteriófago E79tv-2 se obtuvo como un derivado mutante del fago silvestre E79, que fue descrito por primera vez en 1961 por Holloway *et al.* y se caracteriza por ser un fago que puede realizar transducción generalizada, pero por su alta virulencia no permite el crecimiento de las bacterias transductantes. A partir de éste, se aisló un fago mutante que tiene una virulencia atenuada, E79tv-2, que tiene frecuencias de transducción que han podido ser detectadas, aunque suelen variar, y que llega a comportarse como un bacteriófago virulento. E79tv-2 interactúa con el lipopolisacárido de la pared celular de *P. aeruginosa* y se ha considerado de gran importancia para el estudio de *P. aeruginosa* principalmente por su tamaño ( $19.4 \times 10^4$  pb) y peso molecular ( $120 \times 10^6$  g/mol) (Jarrell *et al.*, 1977; Morgan, 1979).

En el presente trabajo se determinó la capacidad del fago E79tv-2 de infectar a las cepas ambientales M10, IGB83 e ID4365 con el fin de evaluar su utilización para llevar a cabo transducción generalizada hacia estas cepas. Esta capacidad de infección se evaluó realizando ensayos de formación de placas de lisis en cada una de las cepas ambientales. Las bacterias se mezclaron con distintas diluciones de un lisado del bacteriófago E79tv-2 y se cultivaron en cajas de medio con agar al 1.5% (ver apéndice 2).

En las cajas correspondientes a las cepas M10 e IGB83 se observaron placas de lisis claramente formadas (figura 7), mientras que en las cajas de la cepa ID4365, de origen marino, no hubo formación de placas. Las placas de lisis de la cepa M10, procedente de Cuatro Ciénegas, resultaron claras y bien definidas, con un diámetro aproximado de 1 mm. Las observadas en las cajas de la cepa IGB83, aislada de la selva de Chiapas, resultaron de un menor tamaño, aproximadamente de 0.6 mm, y sólo fueron evidentes por poco tiempo debido a que el crecimiento del tapete bacteriano las cubrió después de varias horas de incubación. El crecimiento del tapete bacteriano es resultado del nado en enjambre o *swarming*, característico de *P. aeruginosa*, el cual es más evidente en la cepa IGB83.



**Figura 7. Infección de diferentes cepas de *P. aeruginosa* por el bacteriófago E79tv-2.** Placas de lisis en la cepa clínica PAO1 (panel A), y en las cepas ambientales M10 (panel B) e IGB83 (panel C).

Por otra parte, a pesar de los múltiples intentos de infección de la cepa ID4365, no se observó formación de placas de lisis, lo que sugiere que el bacteriófago E79tv-2 es incapaz de infectar a esta cepa marina.

## **2.2. Infección por el bacteriófago F116L**

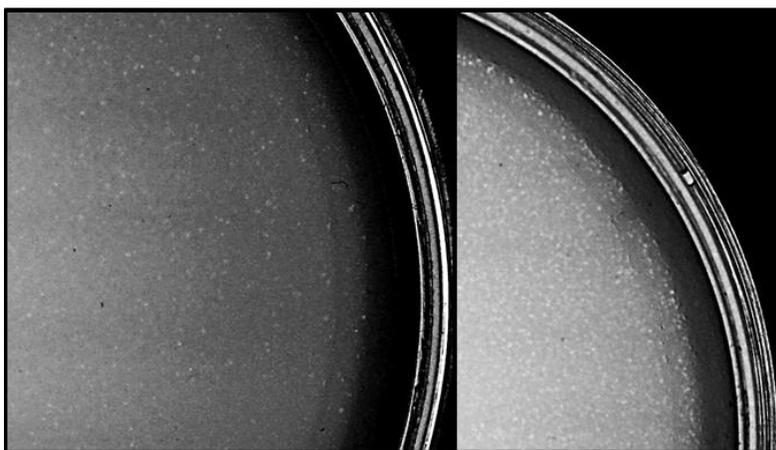
F116L es un bacteriófago temperado capaz de llevar a cabo transducción generalizada en *P. aeruginosa*, el cual fue aislado de la cepa lisogénica silvestre F116 al ser plaqueado en la cepa PAO1 (Krishnapillai, 1971). Se ha estimado que su peso molecular es de  $38 \times 10^6$  g/ mol (Morgan, 1979) y la longitud de su genoma es de  $6.5195 \times 10^4$  pb (Byrne & Kropinski, 2005). Este bacteriófago se une al pili tipo IV de la pared celular de *P. aeruginosa* para inyectar su DNA y llevar a cabo la infección (Pemberton, 1973).

De igual manera que con el bacteriófago E79tv-2, se realizaron ensayos de formación de placas, las cuales se observaron únicamente en la cepa ambiental M10; estas placas son de un menor tamaño al ser comparadas con las placas formadas por el bacteriófago E79tv-2. La nitidez y tamaño de las placas puede observarse en la figura 8. Se debe tomar en cuenta que F116L no es un bacteriófago virulento, lo que puede justificar que las placas en la cepa M10 hayan sido menos evidentes en comparación con las observadas durante la infección del bacteriófago E79tv-2.

La ausencia de placas de lisis en las cajas de la cepa IGB83 después de la infección con el bacteriófago F116L pudo ser resultado de la incapacidad del bacteriófago de concretar una infección

hacia esta cepa, o bien, de que las placas, siendo también de un menor tamaño, hayan sido cubiertas por el crecimiento del tapete bacteriano como resultado del *swarming*, como sucedió en el caso del bacteriófago anterior.

En relación a la cepa ID4365 se realizaron múltiples intentos de infección obteniendo como resultado únicamente el crecimiento del tapete bacteriano. Es decir que esta cepa tampoco pudo ser infectada por el bacteriófago F116L, tal como se había observado para el bacteriófago E79tv-2. Lo anterior puede ser debido a la falta de receptores de ambos bacteriófagos en la membrana bacteriana, a la presencia de sistemas de restricción, o incluso a la presencia de mecanismos de inmunidad en contra de bacteriófagos.



**Figura 8. Infección de a cepa M10 de *P. aeruginosa* por el bacteriófago F116L.** En ambas imágenes se observan las placas de lisis formadas por el bacteriófago F116L en un tapete bacteriano de la cepa ambiental M10.

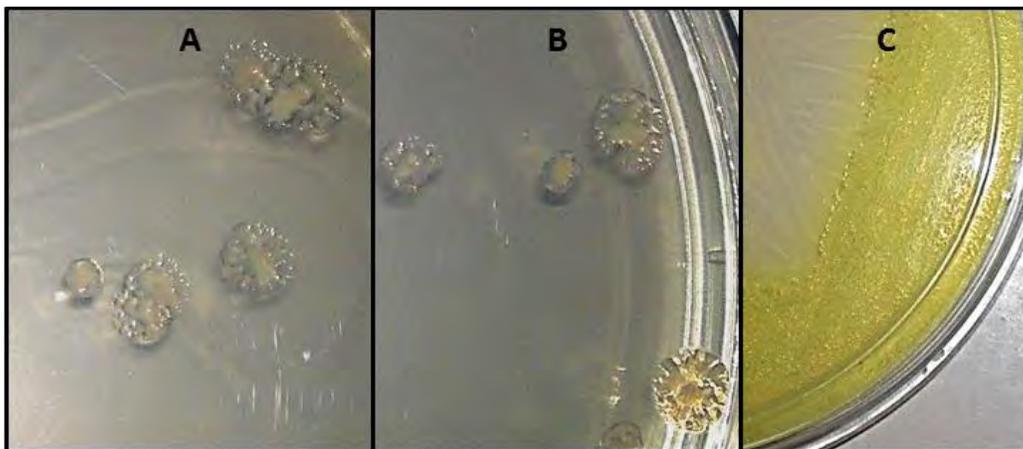
### **3. Transducción generalizada en *P. aeruginosa* mediada por el bacteriófago E79tv-2**

#### **3.1. Cepa donadora PAO1 $\Delta$ rhIRI::aadA1, cepa receptora PAO1**

Con la finalidad de comprobar si es posible llevar a cabo transducción generalizada hacia cepas ambientales mediante el fago E79tv-2, se realizó inicialmente una transducción control utilizando como cepa donadora a PAO1 $\Delta$ rhIRI::aadA1 y como receptora a la silvestre PAO1. En la cepa donadora los genes *rhIR* y *rhII* fueron reemplazados por un *cassette* de resistencia a estreptomicina (*aadA1*). Al eliminar los dos genes que controlan el sistema RhIR de *quorum sensing* es posible diferenciar a esta

cepa mutante por su fenotipo, ya que no produce el pigmento azul característico de este género, la piocianina, cuya síntesis está bajo el control de este sistema (figura 5). La resistencia a estreptomicina ( $Sm^R$ ) tiene como función poder seleccionar positivamente a las bacterias que tengan la mutación una vez que se haya completado el proceso de transducción.

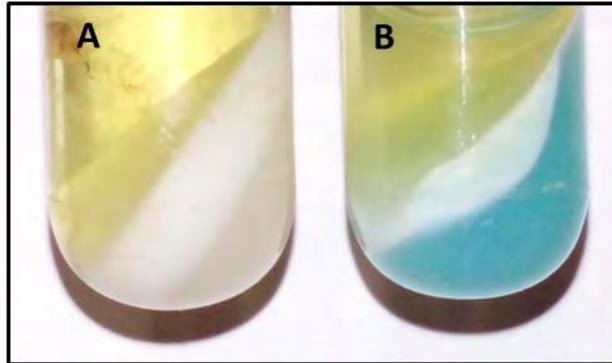
Los resultados obtenidos de la primera transducción nos dan un indicio de su eficiencia entre cepas con cromosomas idénticos. El título del bacteriófago con el que se logró esta transducción fue de  $4 \times 10^{10}$  pfu/mL, con la que se obtuvo el crecimiento de numerosas colonias en las cajas suplementadas con estreptomicina (200  $\mu$ g/ mL). En algunas de estas colonias se pudieron observar pequeñas placas de lisis en su periferia (figura 9), lo que sugirió la presencia de bacteriófago residual en las cajas con la capacidad de llevar a cabo una reinfección de las colonias transductantes. Las colonias obtenidas se purificaron por medio de siembras consecutivas en estría en medio sólido para eliminar al bacteriófago residual que pudiera seguir en contacto con las bacterias.



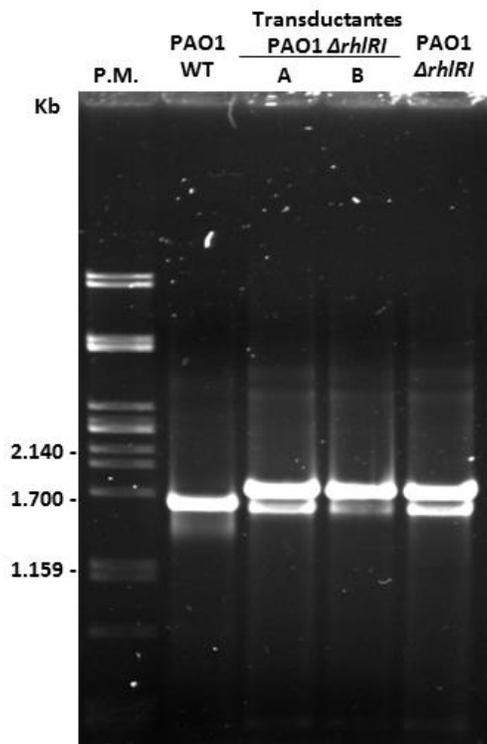
**Figura 9. Transducción de la cepa PAO1 con el bacteriófago E79tv-2.** Se muestran colonias transductantes resistentes a estreptomicina; es posible observar en ellas zonas de lisis dentro de la colonia, claramente visibles hacia la periferia, en los paneles (A) y (B); en el panel (C) se muestra la coloración característica de una transductante  $\Delta rhIRI::aadA1$  de la cepa PAO1 cultivada en cajas de medio King A.

La caracterización fenotípica se realizó utilizando el medio de cultivo King A, en el que se estimula la producción de pigmentos. La cepa mutante produjo un intenso color amarillo fluorescente, lo que sugería la ausencia de piocianina (figura 9). Mediante la extracción de piocianina a partir de sobrenadantes de cultivos crecidos en medio PPGAS, utilizando cloroformo como disolvente orgánico, se

confirmó que las colonias transducentes no producían este pigmento, mientras que la cepa silvestre llevaba a cabo su producción de manera normal (figura 10).



**Figura 10. Extracción de piocianina.** Se realizó la extracción del pigmento utilizando cloroformo como disolvente orgánico. En el panel (A) se observa la extracción de la cepa PAO1 $\Delta$ rhIRI::aadA1, en la que hay ausencia de piocianina. En el panel (B) se observa la extracción de la cepa PAO1 (silvestre), en el que el pigmento azul puede observarse disuelto en la fase orgánica.



**Figura 11. Amplificación por PCR de fragmentos rhIRI de las colonias transducentes de la cepa PAO1.** Los fragmentos fueron amplificados utilizando los oligos “rhIRI-UP” y “rhIRI-DOWN”. En el primer carril se observa el fragmento de 1,650 pb amplificado a partir del DNA de la cepa silvestre PAO1. El segundo y tercer carril muestran los fragmentos de 1,750 pb amplificados a partir de las mutantes de la cepa PAO1 obtenidas por transducción con el bacteriófago E79tv-2. El cuarto carril muestra el fragmento de 1,750 pb amplificado a partir del DNA de la cepa donadora PAO1 $\Delta$ rhIRI::aadA1.

Se comprobó la presencia del *cassette aadA1* por medio de la purificación de DNA total de las cepas donadora, receptora y dos transductantes y su utilización como sustrato para la realización de reacciones de PCR. Los oligonucleótidos utilizados para la PCR fueron *rhIRI-UP/rhIRI-DOWN* que flanquean a los genes *rhIRI*, con lo que se esperaba obtener un fragmento de 1,650 pb en el caso de la cepa silvestre (PAO1) y uno de 1,750 pb en el caso de la cepa mutante donadora (PAO1 $\Delta$ *rhIRI::aadA1*) y las transductantes, en las que fueron reemplazados dichos genes por el *cassette aadA1*. En la figura 11 se puede observar el corrimiento en un gel de agarosa de los productos amplificados. Es posible observar una banda adicional de tamaño ligeramente menor a la de la cepa silvestre en los PCRs de las cepas mutantes. Esta banda siempre se observó en estos PCRs, con una intensidad variable y pudiera deberse a que uno de los oligonucleótidos tenga un segundo sitio de alineamiento dentro de los del fragmento amplificado.

### **3.2. Cepa donadora PAO1 $\Delta$ *rhIRI::aadA1*, cepa receptora M10**

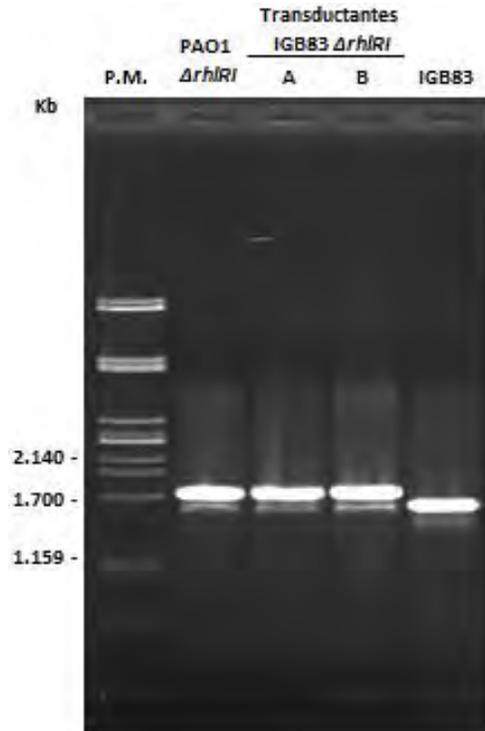
A pesar de que se comprobó que el bacteriófago E79tv-2 es capaz de llevar a cabo una infección en la cepa M10, no hubo crecimiento de colonias como resultado de la transducción. El protocolo de transducción se realizó tres veces sin obtener los resultados esperados. Lo anterior puede tener dos posibles explicaciones: (1) que el bacteriófago haya seguido su ciclo lítico en todas las bacterias, o (2) que el bacteriófago residual haya evitado el crecimiento de colonias después de la transducción, ya que esta cepa se caracteriza por ser de crecimiento más lento que la PAO1.

### **3.3. Cepa donadora PAO1 $\Delta$ *rhIRI::aadA1*, cepa receptora IGB83**

Al utilizar como cepa receptora a IGB83, se observó el crecimiento de colonias después de llevar a cabo la transducción, las cuales fueron purificadas por medio de múltiples siembras en medio sólido para eliminar por completo al bacteriófago residual. La presencia de la mutación en las colonias obtenidas se comprobó por su fenotipo al crecer en medio King A, en donde crecieron colonias con un característico color amarillo fluorescente, lo que es evidencia de la ausencia de piocianina (datos no mostrados). Aunque también es importante mencionar que esta cepa no tiene alta producción de este pigmento.

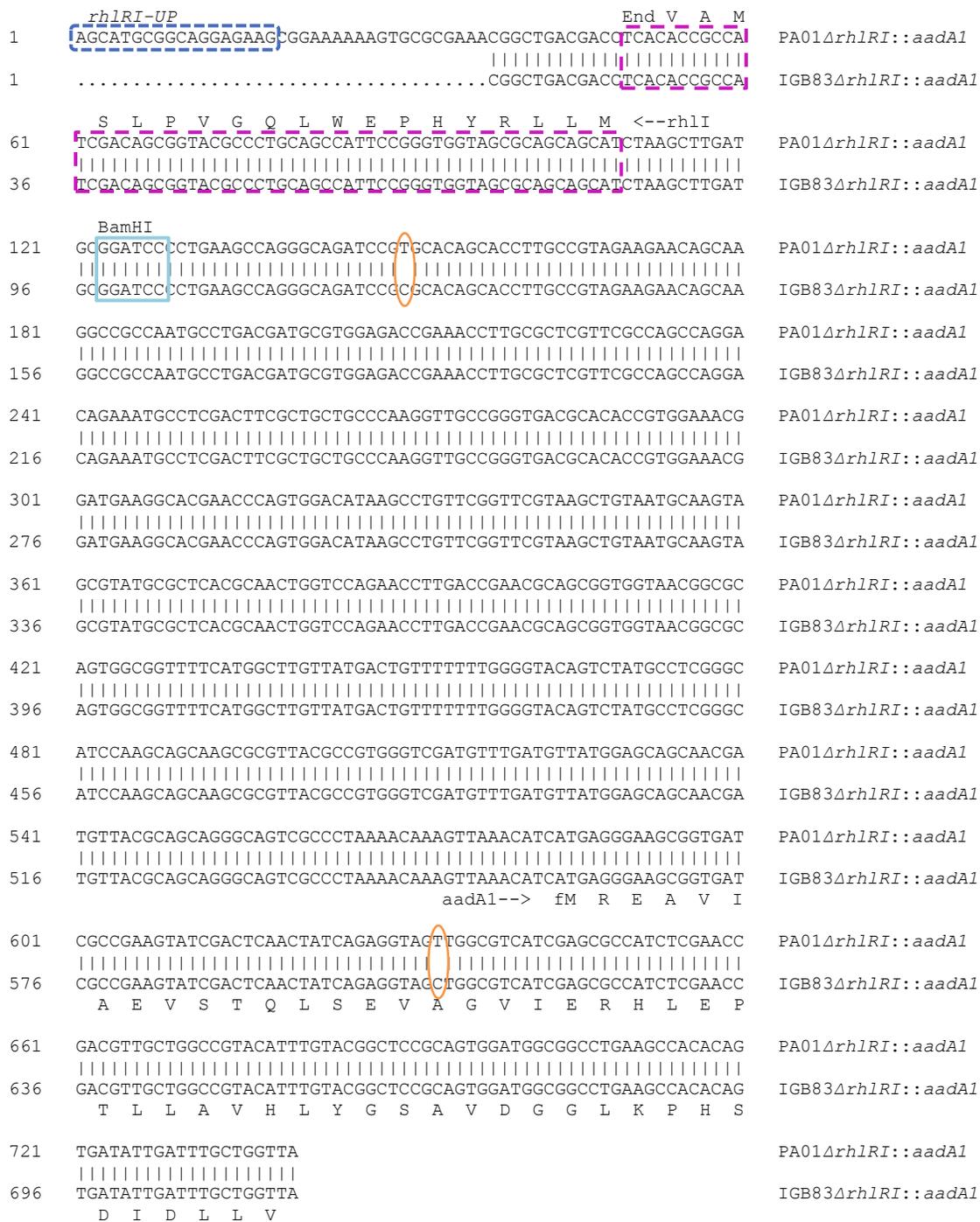
Se corroboró la modificación genética en las transductantes por medio de reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos *rhIRI-UP/rhIRI-DOWN* y se corrieron los fragmentos amplificados en un

gel de agarosa. El tamaño de las bandas correspondientes a las cepas mutadas por transducción resultó ser de 1,750 pb, lo cual coincide con el del fragmento amplificado de la cepa donadora (PAO1 $\Delta$ *rhIRI::aadA1*). Por otra parte la banda del fragmento amplificado utilizando como sustrato el DNA de la cepa silvestre IGB83 mostró un tamaño de 1,650 pb como se puede observar en la figura 12. Como se mencionó anteriormente, se observa una banda adicional de menor tamaño que sugiere que uno de los oligonucleótidos tiene un segundo sitio de alineamiento dentro del fragmento amplificado.



**Figura 12. Amplificación por PCR de fragmentos *rhIRI* de las colonias transductantes de la cepa IGB83.** Los fragmentos fueron amplificados utilizando los oligos “*rhIRI*-UP” y “*rhIRI*-DOWN”. En el primer carril se observa el fragmento de 1,750 pb amplificado a partir del DNA de la cepa donadora (PAO1 $\Delta$ *rhIRI::aadA1*). El segundo y tercer carril muestran los fragmentos de 1,750 pb amplificados a partir de las mutantes de la cepa IGB83 obtenidas por transducción con el bacteriófago E79tv-2. El cuarto carril muestra el fragmento de 1,650 pb amplificado a partir del DNA de la cepa IGB83 silvestre.

Por último, se mandaron secuenciar los fragmentos amplificados por PCR para tener la certeza de la correcta inserción del *cassette*. La secuencia presentó un 98% de identidad al alinearla con la secuencia de la cepa PAO1 $\Delta$ *rhIRI::aadA1*. En este alineamiento se pueden observar dos mutaciones dentro del fragmento de resistencia a estreptomicina, la primera se encuentra en la parte no codificante del gen *aadA1*, mientras que la segunda cambia una valina por una alanina (figura 13). Es posible ver que la inserción del *cassette* de resistencia a estreptomicina está interrumpiendo al gen *rhII* como en la cepa donadora PAO $\Delta$ *rhIRI::aadA1*, lo que confirma la transducción de la mutación hacia la cepa IGB83.



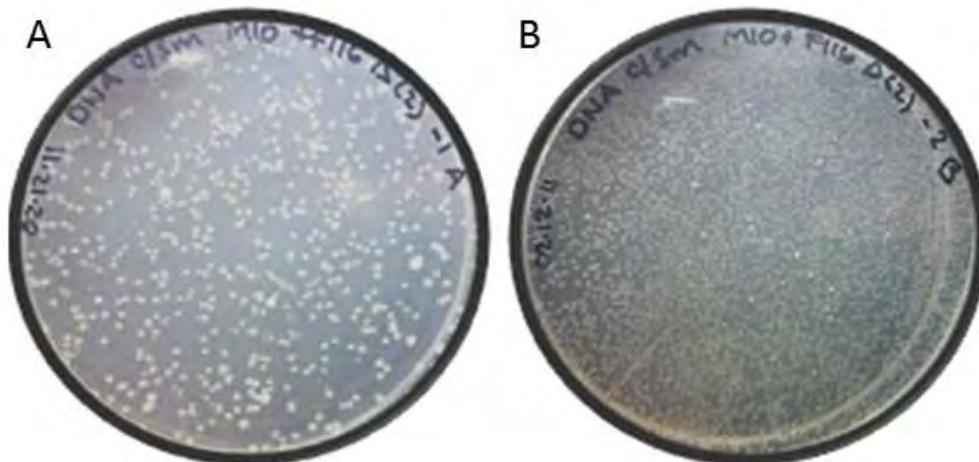
**Figura 13.** Alineamiento entre las regiones de los genes *rhIRI* de las cepas PAO1Δ*rhIRI::aadA1* (línea superior) e IGB83Δ*rhIRI::aadA1* (línea inferior). El oligo “rhIRI-UP” se encuentra marcado por el cuadro punteado de color azul, antecedendo el final del gen *rhII* (cuadro punteado color morado). El sitio de restricción de la enzima *Bam*HI (G/GATCC, cuadro azul) marca el inicio del *cassette* de resistencia a estreptomicina (*aadA1*). El alineamiento muestra un 98% de identidad entre secuencias. Los 2 polimorfismos se encuentran circulados en anaranjado, el primero en la región no codificante del gen *aadA1*, mientras que el segundo tiene como consecuencia el cambio de una valina por una alanina (sin afecciones en el producto).

Se intentó obtener la secuencia también desde el otro extremo del fragmento, utilizando el oligo *rhIRI-UP*, pero el secuenciador arrojó un resultado correspondiente a dos secuencias sobrepuestas, lo cual hace pensar que efectivamente este oligonucleótido tiene otro sitio de unión dentro del fragmento.

#### 4. Transducción generalizada en *P. aeruginosa* mediada por el bacteriófago F116L

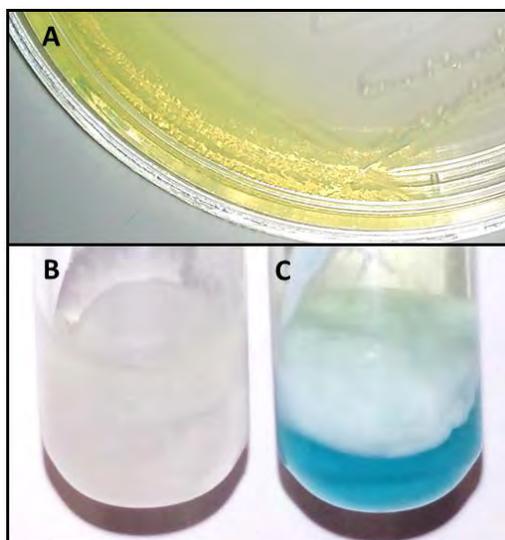
##### 4.1. Cepa donadora PAO1Δ*rhIRI::aadA1*, cepa receptora M10

Con el fin de conocer la capacidad y eficiencia de transducción del bacteriófago F116L se siguió el mismo protocolo utilizando la cepa M10 como receptora. A diferencia de los resultados obtenidos con el bacteriófago E79tv-2, con este bacteriófago sí se logró obtener crecimiento de colonias transductantes con un título de  $17 \times 10^{10}$  pfu/mL (figura 14).

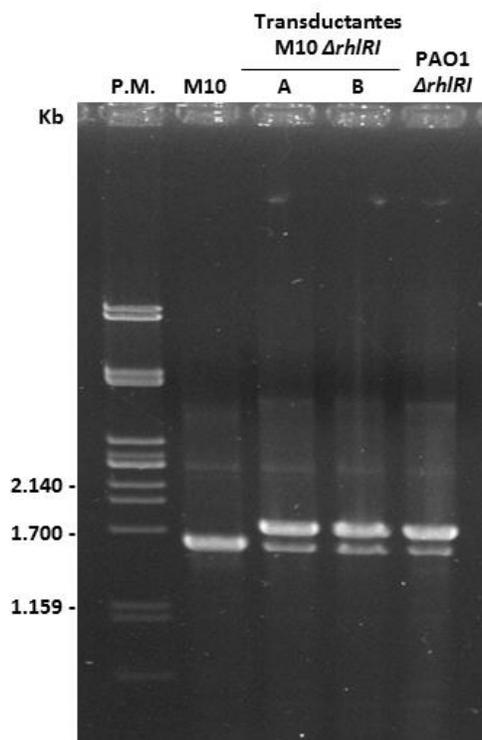


**Figura 14. Transducción de la cepa M10 con el bacteriófago F116L.** En las dos cajas (A y B) se observa el crecimiento de las colonias seleccionadas con estreptomina 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las colonias fueron resultado de la transducción con el fago F116L propagado en la cepa donadora PAO1Δ*rhIRI::aadA1*.

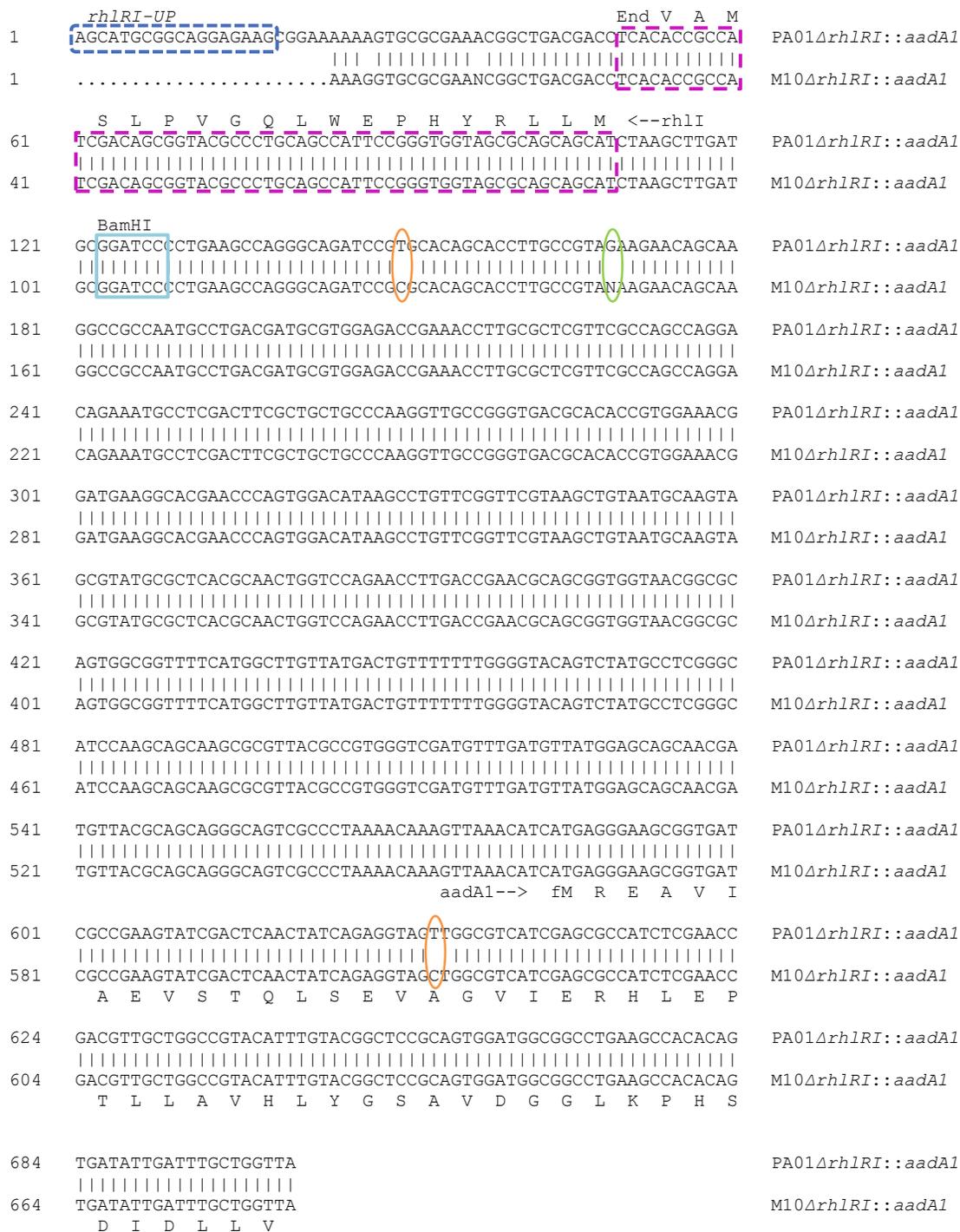
Posteriormente se utilizó el medio de cultivo King A para caracterizar el fenotipo de las colonias mutantes, así como la extracción de pirocianina utilizando cloroformo (figura 15). Como en los casos anteriores, se llevó a cabo una PCR utilizando los oligonucleótidos *rhIRI-UP/rhIRI-DOWN*, en la que se obtuvieron como resultado fragmentos del mismo tamaño en las cepas transductantes y en la cepa donadora (1,750 pb). La presencia de fragmentos de menor tamaño puede ser resultado de un segundo sitio de alineamiento de uno de los oligonucleótidos utilizados para la reacción de PCR (figura 16).



**Figura 15. Caracterización de la transductante M10 $\Delta$ rhIRI::aadA1.** En el panel (A) se observa la coloración que caracteriza la falta de producción de piocianina. Los paneles (B) y (C) muestran el resultado de la extracción de piocianina utilizando cloroformo como disolvente orgánico. El panel (B) corresponde a la cepa transductante M10 $\Delta$ rhIRI::aadA1, mientras que el panel (C) a la cepa silvestre M10.



**Figura 16. Amplificación por PCR de fragmentos *rhIRI* de las colonias transductantes de la cepa M10.** Los fragmentos fueron amplificados utilizando los oligos “rhIRI-UP” y “rhIRI-DOWN”. En el primer carril se observa el fragmento de 1,650 pb amplificado a partir del DNA de la cepa silvestre M10. El segundo y tercer carril muestran los fragmentos de 1,750 pb amplificados a partir de las mutantes de la cepa M10 obtenidas por transducción con el bacteriófago F116L. El cuarto carril muestra el fragmento de 1,750 pb amplificado a partir del DNA de la cepa donadora PAO1 $\Delta$ rhIRI::aadA1.

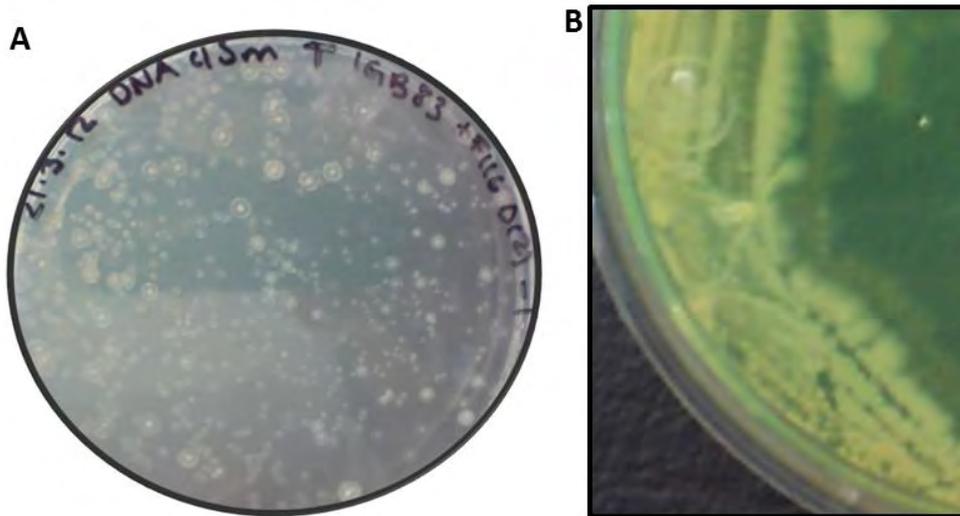


**Figura 17.** Alineamiento entre las regiones de los genes *rhlRI* de las cepas PAO1Δ*rhlRI*::*aadA1* (línea superior) y M10Δ*rhlRI*::*aadA1* (línea inferior). El oligo “*rhlRI*-UP” se encuentra marcado por el cuadro punteado de color azul, antecedendo el final del gen *rhlII* (cuadro punteado color morado). El sitio de restricción de la enzima *Bam*HI (G/GATCC, cuadro azul) marca el inicio del *cassette* de resistencia a estreptomicina (*aadA1*). El alineamiento muestra un 98% de identidad entre secuencias. Los 2 polimorfismos se encuentran circulados en anaranjado, el primero en la región no codificante del gen *aadA1*, mientras que el segundo tiene como consecuencia el cambio de una valina por una alanina. Una base con problemas de secuenciación se encuentra circulada en verde.

Los fragmentos amplificados por PCR se secuenciaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular. Al alinear la secuencia obtenida con la de la cepa donadora PAO1 $\Delta$ rhIRI::aadA1 se confirmó la transducción de la mutación a la cepa M10, pues las secuencias son iguales excepto por los dos cambios anteriores observados en el *cassette* de resistencia a estreptomicina (figura 17).

#### 4.2. Cepa donadora PAO1 $\Delta$ rhIRI::aadA1, cepa receptora IGB83

Tomando en cuenta que existía la posibilidad de que se hubiera llevado a cabo una infección por parte del bacteriófago F116L a la cepa IGB83, pese a que no se hubieran observado placas de lisis, se llevó a cabo el protocolo de transducción generalizada para determinar si existía infección del bacteriófago F116L. Asimismo, a pesar de haber obtenido mutantes de la cepa IGB83 como resultado del proceso de transducción con el bacteriófago E79tv-2, se realizó el procedimiento para conocer si el bacteriófago F116L era capaz de llevar a cabo la transducción utilizando esta cepa como receptora.

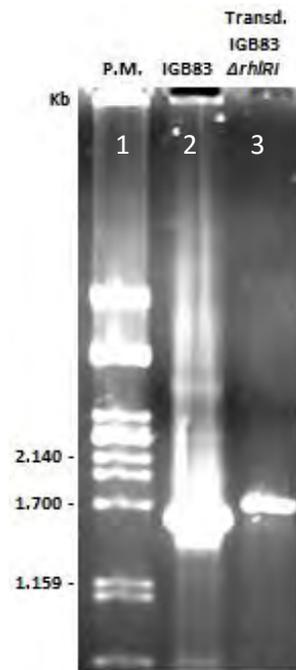


**Figura 18. Crecimiento y caracterización de colonias transductantes de la cepa IGB83.** En el panel (A) se observa el crecimiento de las colonias después de la transducción con el bacteriófago F116L en medio nutritivo con estreptomicina 200 µg/mL. El panel (B) muestra la falta de producción de pirocianina por parte de la cepa transductante IGB83 $\Delta$ rhIRI::aadA1 cultivada en medio King A.

Como resultado de esta transducción se obtuvo el crecimiento de colonias en cajas de medio nutritivo con estreptomicina (200 µg/ mL), las cuales se cultivaron en medio sólido King A para su caracterización fenotípica. Las colonias transductantes crecieron con una coloración amarillo

fluorescente, lo que sugirió la ausencia de producción de piocianina característica de *P. aeruginosa* (figura 18).

Por último se llevó a cabo una PCR utilizando los oligonucleótidos correspondientes, de la que se obtuvo la amplificación de un fragmento de 1,750 pb para la cepa mutante IGB83 $\Delta$ *rhIRI::aadA1*, con lo que se corroboró la presencia del *cassette aadA1* sustituyendo a los genes *rhIR* y *rhII* de la cepa silvestre (figura 19).

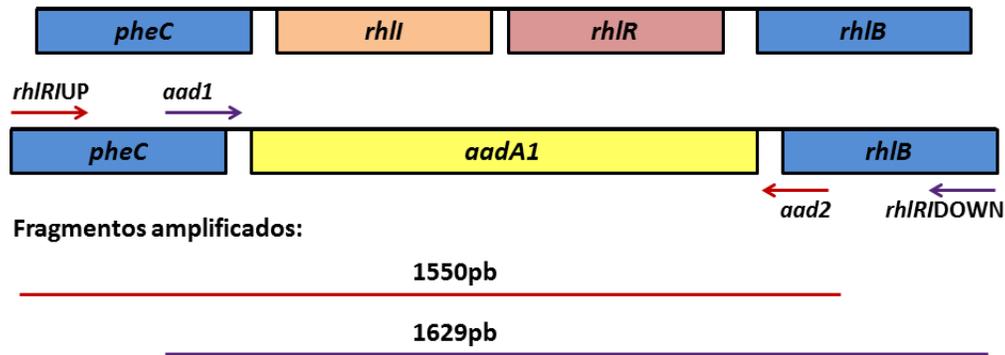


**Figura 19. Amplificación por PCR de los fragmentos *rhIRI* de las colonias transductantes de la cepa IGB83.** Los fragmentos fueron amplificados utilizando los oligos “*rhIRI-UP*” y “*rhIRI-DOWN*”. En el segundo carril se observa el fragmento amplificado de la cepa silvestre IGB83 con una longitud de 1,650 pb. En el tercer carril se observa el fragmento de 1,750 pb amplificado a partir de la mutante de IGB83 obtenida por transducción con el bacteriófago F116L propagado en la cepa PAO1 $\Delta$ *rhIRI::aadA1* como donadora.

### 5. Comprobación de la correcta inserción del *cassette aadA1* mediante PCR

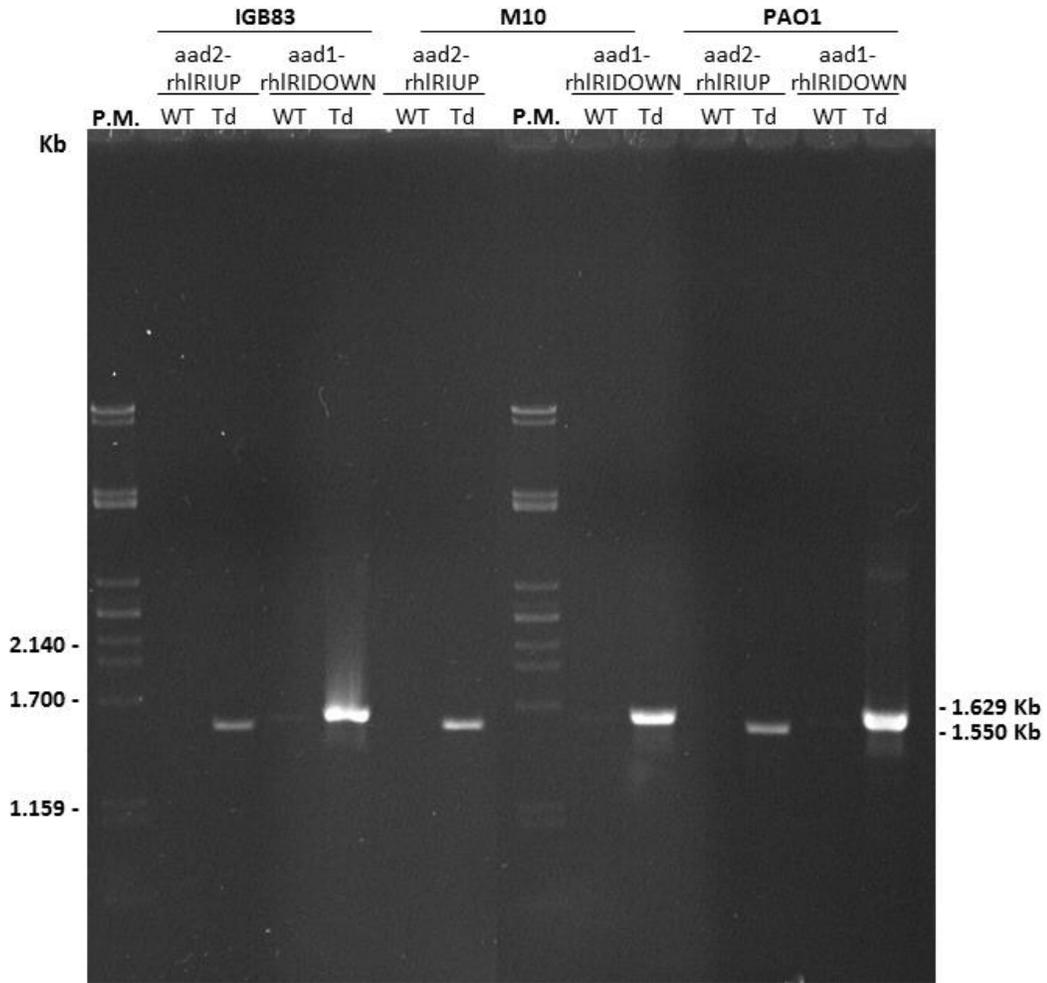
Como se mencionó anteriormente en las figuras 11, 12, 16 y 19 se observa la presencia de dos bandas en los productos de PCR de las colonias transductantes. La banda superior, de 1,750 pb, corresponde al fragmento esperado en las cepas con la mutación  $\Delta$ *rhIRI::aadA1*, con lo cual se corroboró el éxito del protocolo de transducción en los casos anteriores. Por otra parte la presencia del fragmento inferior, de aproximadamente 1,600 pb, variaba en cantidad en cada reacción, desde casi imperceptible hasta

claramente visible, pero siempre en menor cantidad que el fragmento esperado, por lo que decidimos verificar la correcta inserción del gen *aadA1* que sustituye los genes *rhIR* y *rhII* mediante reacciones de PCR adicionales utilizando los pares de oligonucleótidos *rhIRIUP-aad2* y *rhIRIDOWN-aad1*. Como se muestra en la figura 20 el tamaño de los fragmentos amplificados debe corresponder a 1,550 pb y 1,629 pb, respectivamente.



**Figura 20. Ubicación de los oligonucleótidos “rhIRI-UP”, “rhIRI-DOWN”, “aad1” y “aad2” en el genoma de *P. aeruginosa*.** Los oligos “aad1” y “aad2” flanquean el gen de resistencia a estreptomicina (*aadA1*), mientras que los oligos “rhIRI-UP” y “rhIRI-DOWN” flanquean a los genes *rhIR* y *rhII*.

Se realizó el corrimiento de los fragmentos amplificados en un gel de agarosa. El DNA que se utilizó corresponde a las cepas silvestres PAO1, IGB83 y M10, así como a las cepas transductantes *PAO1ΔrhIRI::aadA1*, *IGB83ΔrhIRI::aadA1* y *M10ΔrhIRI::aadA1*. De esta forma se pudo corroborar el tamaño de los fragmentos amplificados con ambos juegos de oligonucleótidos en las cepas transductantes. Como era de esperarse, no hubo amplificación de las cepas silvestres debido a que estas carecen del *cassette aadA1* y por lo tanto de los sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos *aad1* y *aad2* (figura 21). Con este resultado se puede tener la certeza de la correcta inserción del *cassette* en el sitio correspondiente a los genes *rhIR* y *rhII*, y confirmar el éxito de la transducción generalizada en la cepa PAO1, así como de ésta hacia las cepas ambientales IGB83 y M10.



**Figura 21.** Amplificación por PCR de fragmentos que contienen el gen *aadA1* sustituyendo a los genes *rhIR* y *rhII* en las cepas IGB83, M10 y PAO1. Los productos de PCR amplificados corresponden a las cepas transductantes (Td) que tienen el gen *aadA1* presente. Las cepas silvestres (WT) no tuvieron amplificación de fragmentos. Los oligos “aad2-rhIRIUP” producen una banda de 1,550 pb, mientras que los “aad1-rhIRIDOWN” producen una banda de 1,629 pb.

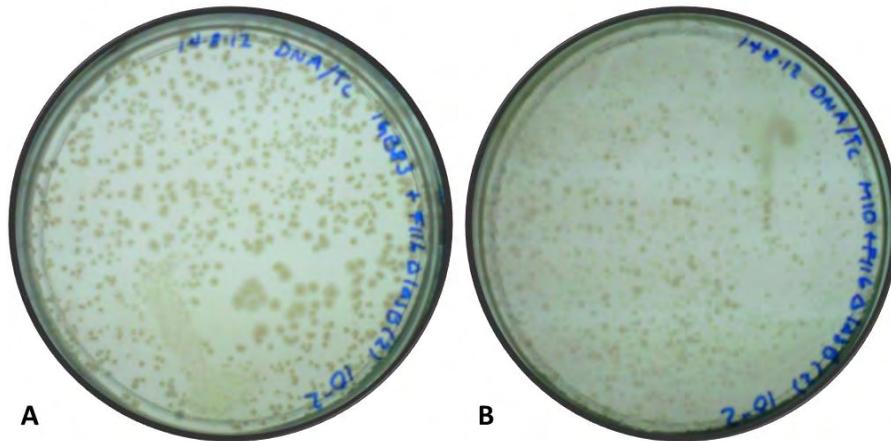
### 6. Transducción de *lasB::TnTc* mediada por el bacteriófago F116L

La cepa PW7302 proviene del banco de cepas mutantes construido por Jacobs *et al.* (2003) y se caracteriza por tener un transposón introducido en el gen *lasB*, lo cual interrumpe al marco abierto de lectura, y por lo tanto provoca la ausencia de su producto, la elastasa LasB. Se determinó si esta mutación provocada por el transposón podía ser introducida a las cepas ambientales de *P. aeruginosa* por medio de transducción generalizada. Con el fin de realizar la transducción de esta mutación a las cepas ambientales M10, IGB83 e ID4365 se utilizó el bacteriófago F116L, tomando en cuenta los resultados obtenidos anteriormente.

El transposón artificial IS*phoA*/hah tiene un tamaño de 4.83Kb y está colocado a 973 pb del inicio del gen *lasB*, el cual tiene una longitud de 1,497 pb. Este transposón se caracteriza por su capacidad de generar fusiones con la fosfatasa alcalina (*phoA*) y por tener un determinante de resistencia a tetraciclina (*tet*) para facilitar la selección positiva de bacterias que tienen el transposón (Jacobs *et al.*, 2003).

### 6.1. Cepa donadora PW7302, cepas receptoras M10, IGB83 e ID4365

Después de realizar el protocolo de transducción generalizada, se obtuvo el crecimiento de un gran número de colonias en cajas de medio nutritivo suplementado con tetraciclina (10 µg/ mL). Las colonias de la cepa M10 se caracterizaron por tener un tamaño menor comparado con las colonias de la cepa IGB83 (figura 22). El protocolo de transducción también fue realizado en la cepa marina ID4365 pero no hubo crecimiento de colonias después de realizar el protocolo.

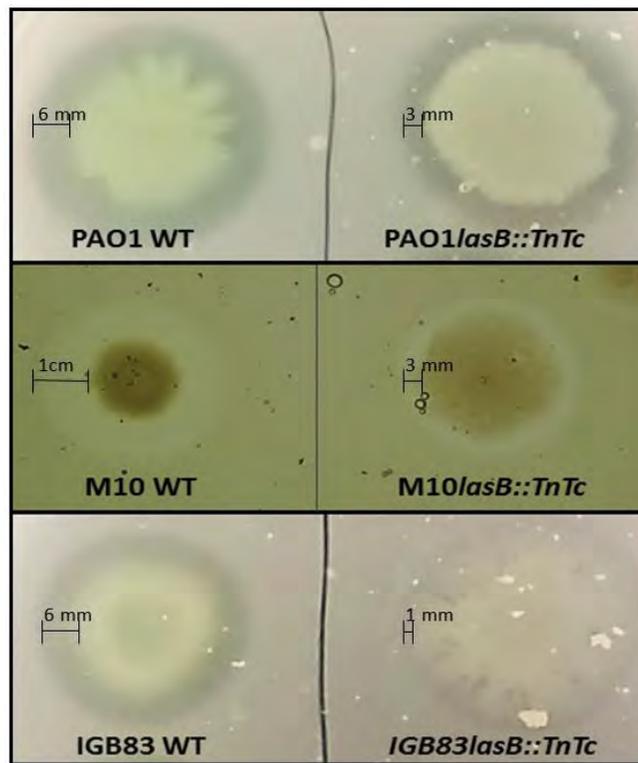


**Figura 22. Transducción de las cepas IGB83 y M10 con el bacteriófago F116L.** En el panel (A) se observa el crecimiento de colonias transductantes de la cepa IGB83, y en el panel (B) se muestran las colonias transductantes de la cepa M10. En ambos casos las colonias mutantes fueron obtenidas por transducción con el bacteriófago F116L propagado en la cepa PW7302 como donadora.

Como se mencionó anteriormente, al no poder transcribirse el gen *lasB* no hay presencia de la elastasa LasB, lo cual se traduce en una menor actividad proteolítica de la bacteria. Esta disminución de proteólisis puede distinguirse cualitativamente cuando se cultiva en un medio sólido suplementado con leche al 1%. Para tal efecto se utilizó el medio de cultivo PY agar 1.5% suplementado con leche al 1% (ver

apéndice 1), en el cual se observó y comparó la actividad proteolítica de las distintas cepas por la presencia, ausencia o disminución de un halo alrededor de las colonias.

Los halos de proteólisis observados alrededor de las colonias silvestres tuvieron un ancho aproximado de 1 cm, en contraste, las colonias de la cepa PW7302 produjeron halos con un grosor de entre 0 y 0.3 cm. En las colonias de las cepas ambientales mutadas mediante transducción se observó la presencia de halos proteolíticos de grosores menores a 0.3 cm (figura 23), lo que sugiere una apreciable disminución de su actividad proteolítica.

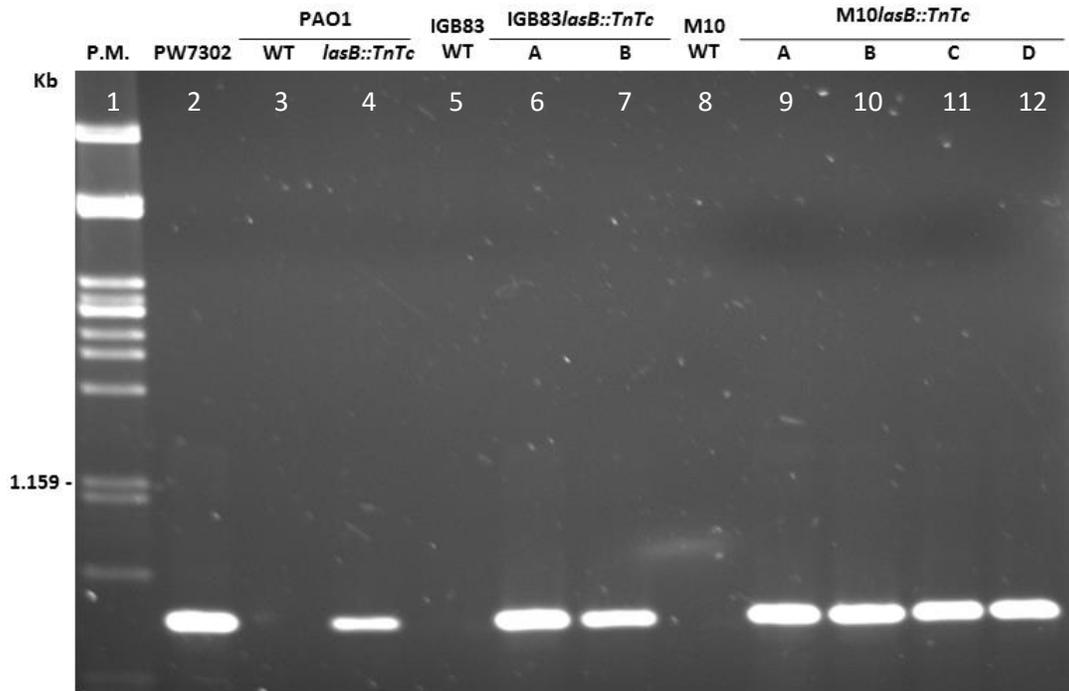


**Figura 23. Halos de proteólisis de colonias de *P. aeruginosa* en medio enriquecido con leche al 1%.** En la imagen se muestra el crecimiento de una colonia de las cepas PAO1, M10 e IGB83 silvestres en la columna del lado izquierdo. En la columna del lado derecho se muestra el crecimiento de una colonia de las cepas PW7302 (PAO1*lasB::TnTc*), M10*lasB::TnTc* e IGB83*lasB::TnTc*. Las colonias mutantes de las cepas M10 e IGB83 son resultado de la transducción con el bacteriófago F116L utilizando la cepa PW7302 como donadora.

Con el fin de comprobar la correcta introducción de la mutación en las cepas transductantes, se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos *Hah-138/LasBRv*, con lo cual se pretendía obtener la amplificación de fragmentos únicamente en las cepas que tuvieran el transposón presente. La secuencia

del oligonucleótido *Hah-138* se encuentra dentro del transposón *ISphoA/hah*, por lo que únicamente se puede empalmar en el DNA de las cepas que lo contengan. Asimismo el oligonucleótido *LasBRv* corresponde a la región que flanquea al gen *lasB* en la dirección correspondiente. El producto amplificado debe tener una longitud de 1,063 pb (Jacobs *et al.*, 2003).

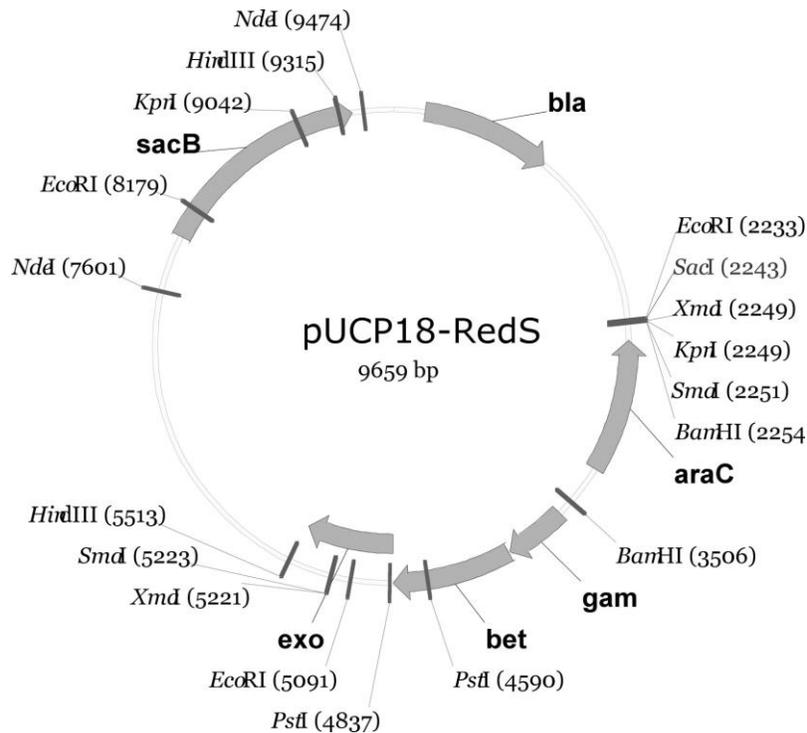
Después de separar los productos de PCR en un gel de agarosa se observó que las cepas silvestres PAO1, IGB83 y M10 no tuvieron amplificación de fragmentos. Las cepas que se caracterizaron por tener una disminución en su actividad proteolítica después de la transducción tuvieron como resultado la amplificación de fragmentos del tamaño esperado (1,063 pb) en todos los casos (figura 24). Con esto se determina la presencia del transposón en las cepas *M10lasB::TnTc* e *IGB83lasB::TnTc* obtenidas mediante transducción.



**Figura 24. Gel de electroforesis de los fragmentos amplificados por PCR.** Los fragmentos fueron amplificados utilizando los oligos “Hah-138” y “LasBRv”. Las cepas silvestres (carriles 3, 5 y 8) no muestran amplificación de fragmento debido a que el oligo “Hah-138” únicamente se apareja con una secuencia dentro del transposón *ISphoA/hah*. El carril 2 muestra el fragmento de cepa donadora PW7302, el carril 4 el fragmento de la mutante PAO1, los carriles 6 y 7 muestran los fragmentos de las mutantes de la cepa IGB83, y los carriles 9, 10, 11 y 12 muestran los fragmentos de las mutantes de M10. Todas las mutantes fueron obtenidas por transducción con el bacteriófago F116L.

## 7. PCR-targeting

La estrategia de PCR-targeting se llevó a cabo con el fin de inactivar los genes cromosomales *toxA* y *lasB* de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa*. Consiste en electroporar un fragmento de DNA, compuesto por un *cassette* de antibiótico flanqueado por regiones homólogas al gen seleccionado, dentro de una cepa que exprese el sistema de recombinación lambda Red (Lesic & Rahme, 2008). Para esto, se introdujo el vector pUCP18-RedS (figura 25) a la cepa clínica PAO1 por transformación. El plásmido pUCP18-RedS se caracteriza por tener clonado el operón Red del bacteriófago lambda, el cual codifica para la proteína inhibidora de nucleasa Red $\gamma$  y las recombinasas específicas de sitio Red $\alpha$  y Red $\beta$ , mediadoras de la recombinación homóloga. En este vector también se encuentra como marcador de contraselección el gen *sacB* de *Bacillus subtilis*, que codifica para la enzima levansacarasa. La expresión de esta enzima resulta tóxica para algunas bacterias gram negativas en presencia de sacarosa, lo que permite la eliminación de las bacterias que contengan el vector religado al crecer en un medio con sacarosa al 10% (Lesic & Rahme, 2008).



**Figura 25. Plásmido pUCP18-RedS.** Compuesto por: el gen *sacB* que codifica para la enzima levansacarasa, con el fin de una rápida curación del plásmido al crecer a la bacteria en un medio complementado con sacarosa 10%; el gen *bla* que codifica para la enzima betalactamasa, lo que le confiere resistencia a antibióticos betalactámicos; el promotor del operón Red, *araC*, inducible con L-arabinosa; y el operón Red con los genes  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . El vector cuenta también con múltiples sitios de restricción (tomado de Lesic & Rahme, 2008).

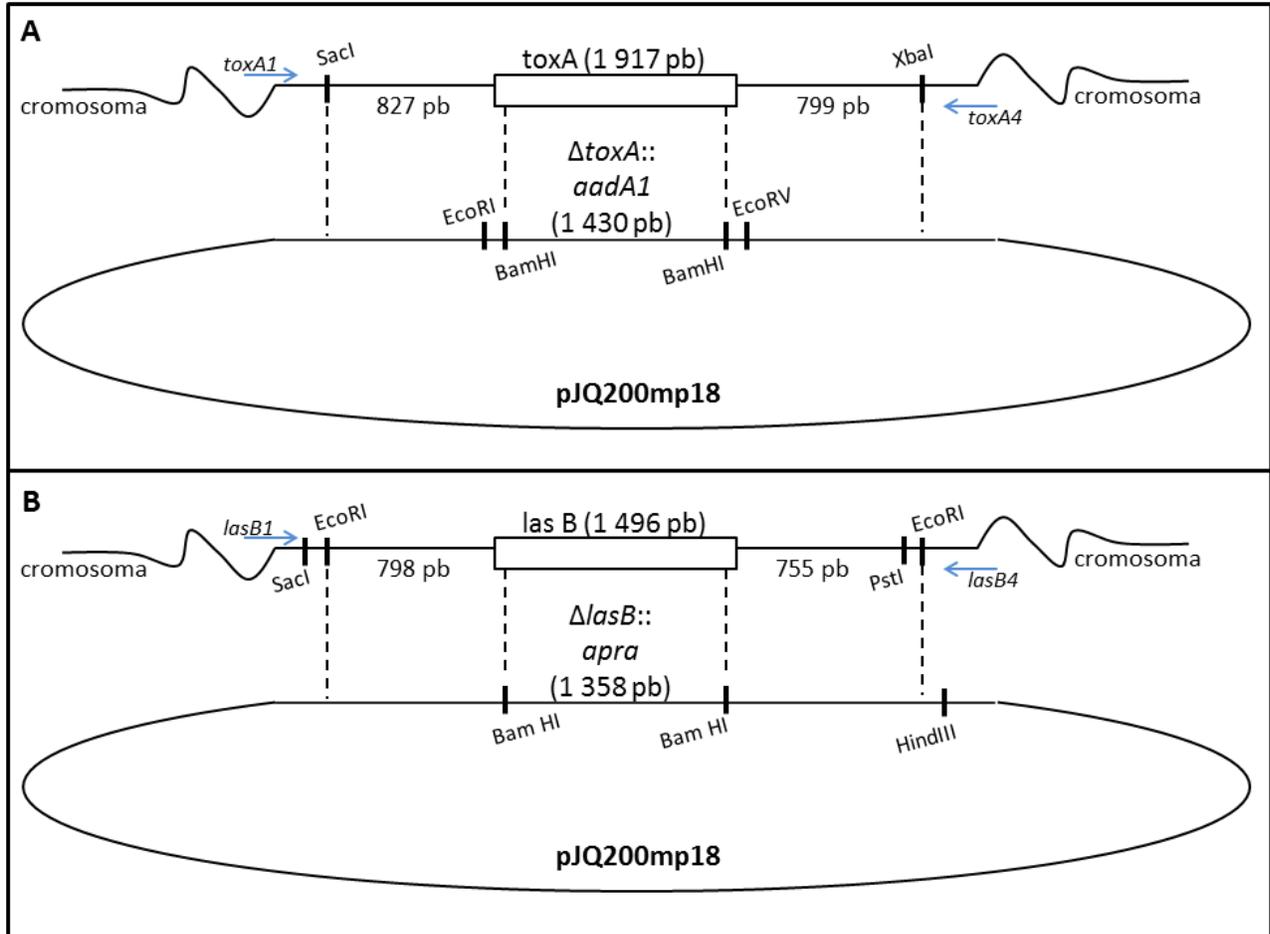
## 7.1. Intentos de interrupción de los genes *toxA* y *lasB* de *P. aeruginosa*

### 7.1.1. Con fragmentos obtenidos por digestión del plásmido pJQ200mp18

En el laboratorio se contaba con los plásmidos pJQ200mp18 $\Delta$ *toxA::aadA1* y pJQ200mp18 $\Delta$ *lasB::apra*, los cuales contienen las regiones aledañas a los genes *toxA* y *lasB* flanqueando genes de resistencia a estreptomicina y apramicina, respectivamente, como se muestra en la figura 26.

Al digerir 20  $\mu$ g del plásmido pJQ200mp18 $\Delta$ *lasB::apra* utilizando la enzima *EcoRI*, se obtuvieron tres fragmentos de restricción, entre los que se encontraba el *cassette* flanqueado por las regiones de identidad. La digestión de 20  $\mu$ g del plásmido pJQ200mp18 $\Delta$ *toxA::aadA1* únicamente se concretó en el sitio de restricción de *SacI*, pero no pudo llevarse a cabo la restricción en el sitio de *XbaI*, lo cual pensamos que se debió a alguna mutación posterior a la clonación que eliminó el sitio. Por lo tanto el primer intento se realizó solamente con el fragmento  $\Delta$ *lasB::aadA1*.

Para transformar a la cepa PAO1/pUCP18-RedS, esta se creció por 1.5 horas con L-arabinosa 0.2% para asegurar la inducción de las proteínas del operón lambda Red (ver apéndice 2). Después de transformar la cepa PAO1/pUCP18-RedS con el fragmento recuperado de la digestión del plásmido pJQ200mp18 $\Delta$ *lasB::apra*, se obtuvieron colonias en cajas de medio con apramicina. Las colonias se observaron en número y tamaño similar que en el control negativo en el que se realizó el mismo proceso pero sin adicionar al fragmento, lo que sugirió poca probabilidad de que se hubiera llevado a cabo la recombinación homóloga con el fragmento introducido. El crecimiento de colonias en estas condiciones pudo ser resultado de dos opciones: (1) que el fragmento con el *cassette* se haya incorporado al cromosoma bacteriano por recombinación en algún otro sitio, lo cual es poco probable, o bien, (2) que las bacterias hayan podido crecer en presencia del antibiótico, aún sin haber incorporado el fragmento con el *cassette*, por el surgimiento de alguna mutación de resistencia espontánea. Es característico de *P. aeruginosa* su alta resistencia a antibióticos por la baja permeabilidad de su pared celular y la actividad de bombas de eflujo (Lambert, 2002).



**Figura 26. Composición de los plásmidos pJQ200mp18 $\Delta$ toxA::aadA1 y pJQ200mp18 $\Delta$ lasB::apra.** Se muestran los tamaños de las regiones que flanquean a los genes *toxA*, en el panel (A), y *lasB*, en el panel (B), así como los sitios de restricción utilizados y el fragmento clonado en el vector pJQ200mp18.

Para corroborar cuál de las dos opciones fue la que sucedió, se realizó una PCR con el DNA de varias colonias utilizando los oligonucleótidos *lasB1* y *lasB4* (figura 26) y se corrió un gel de agarosa para observar y comparar los tamaños de los fragmentos amplificados. Sin embargo en esta reacción de PCR no hubo amplificación de fragmentos de DNA, por lo que se realizó un segundo intento, del cual tampoco se obtuvo amplificación. La falta de amplificación probablemente se debió a que el tamaño del fragmento a amplificar era muy grande.

### 7.1.2. Con fragmentos obtenidos por PCR del plásmido pJQ200mp18

Con el fin de obtener una mayor cantidad de DNA de los fragmentos para la transformación se llevó a cabo una digestión de 7  $\mu$ g de cada uno de los plásmidos (pJQ200mp18 $\Delta$ toxA::aadA1 y

pJQ200mp18 $\Delta$ lasB::Apra) con las enzimas de restricción *Xba*I y *Hind*III respectivamente, para linearizarlos. Se amplificaron los fragmentos de DNA requeridos a partir de la digestión realizada utilizando los oligonucleótidos *tox*A1/*tox*A4 y *las*B1/*las*B4, y se corrió un gel de agarosa para su observación. Como resultado se obtuvieron los fragmentos  $\Delta$ *tox*A::*aad*A1 de 3,056 pb y  $\Delta$ *las*B::Apra de 2,911 pb.

Al transformar a la cepa PAO1/pUCP18-RedS con 300 ng de cada uno de los fragmentos se obtuvo crecimiento de colonias resistentes a estreptomicina y apramicina, dependiendo del fragmento introducido. Para asegurar la expresión del operón lambda Red presente en el plásmido pUCP18-RedS se creció a la cepa con L-arabinosa 0.2% dividida en dos cultivos, el primero por 1.5 horas y el segundo por 2.5 horas, antes de la transformación.

Se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos *tox*A1/*tox*A4 y *las*B1/*las*B4 para corroborar si se había llevado a cabo recombinación de los fragmentos introducidos por electroporación con el DNA de la bacteria hospedera. Los fragmentos amplificados de las cepas silvestres y las cepas transformadas fueron del mismo tamaño en ambos casos. Esto sugiere que el fragmento electroporado no se incorporó al cromosoma de la cepa PAO1/pUCP18-RedS debido a dos posibilidades: (1) que la cantidad de DNA del fragmento no haya sido suficiente para que se llevara a cabo la recombinación, o (2) que el operón lambda Red no se esté induciendo adecuadamente y las proteínas Red $\gamma$ , Red $\alpha$  y Red $\beta$  no estén presentes para mediar la recombinación.

### **7.1.3. Con fragmentos obtenidos por digestión del plásmido pJQ200mp18 $\Delta$ *tox*A::*aad*A1 para obtener regiones homólogas de aproximadamente 100 pb**

Lesic y Rahme (2008) demostraron que la longitud mínima de las regiones homólogas que componen al fragmento para transformación en *P. aeruginosa* PA14 es de 100 pb, por lo que se realizó la una reacción de restricción 20  $\mu$ g del plásmido pJQ200mp18 $\Delta$ *tox*A::*aad*A1 con las enzimas *Eco*RI-*Eco*RV, con el fin de obtener un fragmento compuesto por el *cassette* de estreptomicina flanqueado por mínimo 100 pb a cada lado, teniendo este una longitud final de 1,976 pb; lo anterior se hizo dada la pérdida del sitio de *Xba*I (figura 26).

El fragmento se introdujo por electroporación a la cepa PAO1/pUCP18-RedS previamente inducida por 1.5 y 2.5 horas con L-arabinosa (2%), y al sembrarla en cajas con medio con estreptomicina (200 µg/ mL) se obtuvo crecimiento de colonias. En las cajas control suplementadas con antibiótico, se observó también el crecimiento de colonias. Se compararon las colonias electroporadas con las de cajas control y se observaron diferencias en cuanto a la definición del contorno de las colonias. Las colonias en los controles presentaban un margen filamentosos, mientras que en las cajas de colonias electroporadas presentaban contornos más definidos.

Para corroborar si en las bacterias electroporadas se llevó a cabo la recombinación del fragmento con el cromosoma bacteriano se realizaron reacciones de PCR con los oligonucleótidos *toxA1/toxA4* y se realizó una reacción de restricción de los productos amplificados, ya que en la cepa silvestre y en la mutante los fragmentos esperados de la amplificación son de tamaños muy similares; se buscó una enzima que permitiera diferenciar el patrón de restricción del fragmento mutante y del fragmento silvestre y se llevó a cabo la digestión con la enzima *Bam*HI. Todas las muestras tuvieron el patrón correspondiente a la secuencia silvestre, es decir, en ningún caso se obtuvo la mutación deseada (datos no mostrados). Por lo tanto, no nos fue posible obtener mutantes mediante la técnica basada en el sistema lambda Red en *P. aeruginosa*.

## CONCLUSIONES

- La identidad que existe entre los genomas de la cepa clínica PAO1 y las cepas aisladas del ambiente M10, IGB83 e ID4365 es mayor al 98% en las regiones de los genes de virulencia *rhIR*, *rhII*, *lasB* y *toxA*.
- Se observó que los bacteriófagos E79tv-2 y F116L son capaces de realizar una infección en las cepas ambientales M10 e IGB83, así como en la cepa clínica PAO1. No obstante la infección no se llevó a cabo en la cepa ID4365 por parte los bacteriófagos utilizados.
- Los bacteriófagos E79tv-2 y F116L tienen la capacidad de realizar transducción generalizada utilizando la cepa clínica PAO1 como donadora. Por una parte E79tv-2 es capaz de transducir cuando se utiliza como receptora a la ambiental IGB83, mientras que F116L puede concretar la transducción utilizando como receptoras a las cepas ambientales M10 e IGB83. Por lo tanto la capacidad de transducción de los bacteriófagos está relacionada con la cepa que se utilice como receptora.
- Se obtuvieron las cepas ambientales M10 e IGB83 sin los genes de virulencia *rhIR*, *rhII* y *lasB* por medio de transducción generalizada utilizando la cepa clínica PAO1, sin los genes de virulencia, como donadora.

## PERSPECTIVAS

- Se propone realizar la búsqueda de un bacteriófago que sea capaz de llevar a cabo la transducción generalizada en la cepa ID4365 con el fin de eliminarle los genes de virulencia.
- Obtener un mayor número de genes de virulencia mutados en *P. aeruginosa* PAO1 para su transducción a las cepas ambientales IGB83, M10 e ID4365.
- Para corroborar la seguridad de utilizar esta bacteria dentro de distintas áreas de investigación, así como a nivel industrial, es necesario determinar la virulencia de las cepas ambientales mutadas en este trabajo por medio de algún modelo de infección.
- Optimizar la implementación de la técnica de PCR-targeting en *P. aeruginosa* PAO1 para mutar genes específicos en esta cepa y seguir utilizándola como donadora en la transducción generalizada.
- Intentar llevar a cabo la estrategia de PCR-targeting en las cepas ambientales M10, IGB83 e ID4365 de *P. aeruginosa* con el fin de mutar directamente los genes de virulencia en estas cepas ambientales.

## APÉNDICE 1

### Medios de cultivo, antibióticos, buffers y reactivos

#### Medio nutritivo (Difco Nutrient Agar)

Agar nutritivo 2.3 g

Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

#### Medio suave (Soft Nutrient Agar)

Caldo nutritivo Difco 0.4 g

Agar 0.25 g

Ajustar pH a 7.0 con NaOH 1N

Aforar a 50 mL con agua Milli-Q

#### Medio YT2X (Sambrook & Russell, 2011)

Bactotriptona 1.6 g

Extracto de levadura 1.0 g

NaCl 0.7 g

Ajustar pH a 7.2 con NaOH 1N

Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

#### Medio LB (Sambrook & Russell, 2011)

NaCl 1.0 g

Bactotriptona 1.0 g

Extracto de levadura 0.5 g

Agar 1.5 g

Ajustar pH a 7.0 con NaOH 1N

Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

**Medio LB 10% sacarosa**

Bactotriptona            1.0 g  
Extracto de levadura    0.5 g  
Sacarosa                    10 g  
Agar                         1.5 g  
Ajustar pH a 7.0 con NaOH 1N  
Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

**PY 1% leche**

Peptona                    0.5 g  
Extracto de levadura    0.3 g  
Agar                         1.5 g  
Aforar a 90 mL con agua Milli-Q  
Leche                        1.0 g  
Aforar a 10 mL con agua Milli-Q  
Mezclar ambas partes después de esterilizar (únicamente 15 min.)

**Medio SOB (Sambrook & Russell, 2011)**

Triptona                    2.0 g  
Extracto de levadura    0.5 g  
NaCl                        0.05 g  
Ajustar pH a 7.0 con NaOH 1N  
Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

**Medio KingA**

Peptona                    2.0 g  
K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>                    1.0 g  
MgCl<sub>2</sub>                    0.35 g  
Agar                         1.5 g  
Glicerol                    1.0 g  
Ajustar pH a 7.2-7.4 con NaOH 1N  
Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

**Medio PPPGAS (Wild *et al.*, 1997)**

NH<sub>4</sub>Cl                    0.1068 g

KCl                        0.1462 g

Tris                        1.453 g

Peptona                  1.0 g

Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

Ajustar pH a 7.4 con HCl 1N

Después de esterilizar, añadir:

MgSO<sub>4</sub>                    0.16 mL

Glucosa 20%            2.5 mL

**Buffer TMN**

Tris-HCl                10mM, pH 7.4

Mg SO<sub>4</sub>                10mM

NaCl                    150mM

**TE 25mM**

Tris-HCl 1M, pH 8    2.5 mL

EDTA 0.5M, pH 8    5.0 mL

Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

**TE 10mM**

Tris-HCl 10mM, pH 8 1.0 mL

EDTA 0.1mM, pH 8   20 µL

Aforar a 100 mL con agua Milli-Q

## APÉNDICE 2

### Protocolos

#### 1. Ensayo en placa

- Crecer las células receptoras en 10 mL de medio YT2X a la temperatura correspondiente (30°C cepas ambientales, 37°C PAO1) con agitación de 200 rpm durante 12 horas
- Inocular 10 mL de YT2X (1/50) con el cultivo anterior e incubar a 30°C o 37°C, 200 rpm, hasta la fase logarítmica (aproximadamente 4 horas)
- Centrifugar las células a 3 500 rpm por 10 minutos
- Descartar el sobrenadante y lavar el paquete celular 2 veces con medio YT2X
- Resuspender el paquete celular en 1 mL de medio YT2X
- Hacer diluciones del bacteriófago (hasta  $10^{-8}$ ) en buffer TMN
- Fundir el medio suave y mantener en baño a 45°C
- Mezclar en un tubo 50  $\mu$ L de células receptoras con 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones del bacteriófago
- Incubar durante 20 minutos a la temperatura correspondiente
- Añadir 3 mL de medio suave y mezclar con vórtex inmediatamente (para evitar solidificación)
- Verter la mezcla sobre una placa de medio nutritivo enriquecido con  $\text{MgSO}_4$  (0.01 M)
- Incubar a temperatura ambiente hasta que las placas se enfríen
- Incubar de 16 a 24 horas a la temperatura correspondiente

## **2. Preparación de stocks (lisados) de fagos de alto título**

- A partir del ensayo en placa, tomar una caja completamente lisada, raspar, coleccionar y resuspender el medio suave en un tubo con 5 mL de buffer TMN
- Lavar la caja con 5 mL adicionales de buffer TMN y agregarlos al tubo
- Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora mezclando ocasionalmente con vórtex
- Centrifugar a 10 000 rpm por 10 minutos
- Recuperar el sobrenadante y filtrarlo por filtro Millipore de 0.45µm
- Conservar en refrigeración a 4 °C

### 3. Transducción generalizada mediada por bacteriófagos E79tv-2 y F116L

- Preparar un stock de fagos de alto título propagado dos veces sobre la cepa donadora
- Crecer la cepa receptora en 10 mL de medio YT2X a 30°C durante 12 horas a 200 rpm
- Inocular 200  $\mu$ L del cultivo anterior en 10 mL de medio YT2X e incubar hasta la mitad de la fase logarítmica (DO 0.6-1.0 a 600 nm)
- Centrifugar a 3 500 rpm por 10 minutos y resuspender el paquete celular en 1 mL de medio
- Mezclar 0.5 mL de células concentradas con 100  $\mu$ L de cada una de las diluciones del bacteriófago por 20 minutos a 30°C
- Centrifugar a 3 500 rpm por 10 minutos y resuspender el paquete celular en 0.5 mL de medio
- Plaquear 100  $\mu$ L de las células en cajas de medio nutritivo con el antibiótico requerido
- Incubar las cajas a 30°C por 24 a 72 horas para obtener crecimiento de colonias transductantes

Los controles deben incluir (1) células receptoras mezcladas con buffer TMN y (2) diluciones de bacteriófagos.

#### 4. Extracción de DNA cromosomal

- Centrifugar 1 mL de células a 5 000 rpm por 5 minutos
- Resuspender el paquete celular en 0.5 mL de solución de lisozima (2.5 mg/ mL) y RNAsa (2 mg/ mL) en buffer TE 25mM e incubar a 37°C por 10 minutos
- Agregar 250 µL de SDS 2% y mezclar con vórtex por 1 minuto
- Agregar 250 µL de fenol-cloroformo (1:1) y mezclar con vórtex por 1 minuto
- Centrifugar a 10 000 rpm por 5 minutos y recuperar la fase acuosa
- Repetir las extracciones con fenol-cloroformo hasta que la interfase se vea limpia
- Recuperar la fase acuosa en un tubo limpio
- Precipitar agregando 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y 1 volumen de isopropanol
- Mezclar por inversión hasta visualizar una malla de DNA
- Recuperar la malla y transferirla a un tubo con buffer TE 10mM (spooling)
- Repetir la precipitación y el *spooling* hasta que el sobrenadante se vea totalmente limpio
- Extraer el líquido dejando sólo la malla y dejar secar por 5 minutos a 50°C
- Resuspender en 400 µL de TE 10mM e incubar a 55°C hasta que se resuspenda completamente
- Agregar 5µL de RNAsa (10 mg/ mL) e incubar a 37°C por 1 hora
- Extraer con fenol-cloroformo hasta que la interfase se vea limpia
- Precipitar con acetato de sodio 3M e isopropanol
- Recuperar y secar la malla por 5 minutos a 50°C
- Lavar con 0.5 mL de etanol 70% frío y secar la malla
- Resuspender en 200 µL de TE 10mM

## 5. PCR (Sambrook & Russell, 2001)

- Para 50  $\mu\text{L}$  de reacción:

Buffer 10X –Mg	5.0 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1.5 $\mu\text{L}$
dNTP 10mM	1.0 $\mu\text{L}$
Mezcla de oligonucleótidos 10mM (cada uno)	1.0 $\mu\text{L}$
DMSO 50%	10 $\mu\text{L}$
Taq DNA polimerasa	0.5 $\mu\text{L}$
DNA (templado) 10 ng/ $\mu\text{L}$	>1.0 $\mu\text{L}$

Aforar a 50  $\mu\text{L}$  con agua destilada estéril

- Incubar el tubo en un termociclador a 95°C por 4 minutos
- Realizar 30 ciclos como el siguiente:

Desnaturalización      95°C por 1 minuto

Alineamiento      55°C por 1 minuto (la temperatura y el tiempo pueden variar dependiendo de los oligos utilizados y el tamaño del producto a amplificar)

Polimerización      72°C por 2 minutos

- En el último ciclo mantener la temperatura de polimerización por 10 minutos
- Analizar los productos amplificados a través de un gel de electroforesis

## 6. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) (Sambrook & Russell, 2001)

- Correr un gel de agarosa LMP al 0.6% y teñir con bromuro de etidio (1 µg/ µL)
- Cortar la banda deseada iluminando con luz UV de onda larga
- Transferir la banda a un tubo de polipropileno y fundirla a 65-70°C por 10 minutos
- Agregar 0.1 vol. de NaCl 5M, mezclar e incubar a 65-70°C por 5 minutos
- Saturar fenol de la siguiente manera: Anadir 400 µL de agua estéril, 100 µL de NaCl 5M y 500 µL de fenol en un tubo limpio. Mezclar y centrifugar a 13,500 rpm por 1 minuto. Retirar la fase acuosa y e incubar el fenol saturado a 37°C
- Transferir la agarosa fundida a 37°C e incubarla por 2 minutos
- Agregar al tubo con la agarosa 2/3 vol. de fenol saturado con NaCl e inmediatamente agitar con vórtex
- Centrifugar a 13 500 rpm por 5 minutos y pasar la fase acuosa a un tubo limpio
- Añadir al tubo con la agarosa 90 µL de TE 10mM y 10 µL de NaCl 5M. Mezclar con vórtex y centrifugar a 13,500 rpm por 2 minutos. Recuperar la fase acuosa y mezclar con la anterior
- Agregar a la fase acuosa 1 volumen de fenol-cloroformo y mezclar con vórtex
- Centrifugar a 13,500 rpm por 2 minutos y transferir la fase acuosa a un tubo limpio
- Agregar 1 volumen de cloroformo, mezclar con vórtex y centrifugar a 13,500 rpm por 2 minutos
- Recuperar fase acuosa en un tubo limpio y agregar 1 µL de glucógeno (20 µg/ µL) y 1 volumen de isopropanol
- Mantener a -20°C por al menos 2 horas
- Centrifugar a 13,500 rpm por 10 minutos y sacar todo el alcohol hasta dejar seca la pastilla
- Resuspender en un volumen adecuado de TE 10mM

## 7. Transformación de *Escherichia coli* por electroporación

- Crecer un precultivo de *E. coli* en medio SOB a 37°C por 12 horas
- Inocular 20 mL de medio SOB con el precultivo hasta una DO de 0.1 a 600 nm
- Incubar a 37°C hasta alcanzar una DO de 0.6 a 600 nm
- Centrifugar a 5 500 rpm por 5 minutos
- Lavar 3 veces con glicerol 10% frío
- Resuspender el paquete celular en 200 µL de glicerol 10%
- Colocar 60 µL de células en un tubo de polipropileno, añadir 1 µL de DNA plasmídico y mezclar con micropipeta
- Transferir la mezcla a una celda de electroporación mantenida en hielo
- Dar un pulso de 1.6 kV en el electroporador
- Agregar 1 mL de medio YT2X, mezclar con micropipeta y transferir a un tubo de ensaye
- Incubar a 37°C por una hora
- Transferir a un tubo de polipropileno y centrifugar a 6 000 rpm por 10 minutos
- Resuspender el paquete celular en 300 µL de medio YT2X
- Hacer diluciones e inocular 100 µL de cada una en cajas con medio LB con el antibiótico requerido
- Incubar a 37°C por 12 horas

## 8. Preparaciones de plásmidos (Sambrook & Russell, 2001)

- Centrifugar 1 mL de cultivo a 13,500 rpm por 2 minutos y resuspender la pastilla en 100  $\mu$ L de TE 25mM
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos
- Agregar 200  $\mu$ L de una solución fresca de NaOH 0.2N/ SDS 1% y mezclar por inversión vigorosa hasta que se vea transparente, homogéneo y viscoso
- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos
- Agregar 150  $\mu$ L de acetato de potasio 3M (pH 4.8) y mezclar por inversión hasta que pierda la viscosidad y se vea un precipitado blanco
- Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos
- Centrifugar a 5 000 rpm por 5 minutos y recuperar el sobrenadante
- Agregar 400  $\mu$ L de fenol-cloroformo (1:1) y mezclar con vórtex por 30 segundos
- Centrifugar a 13,500 rpm por 2 minutos y recuperar la fase acuosa en un tubo limpio
- Agregar 1 mL de etanol 100% frío y dejar precipitando a temperatura ambiente por 5 minutos
- Centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender la pastilla seca en 50  $\mu$ L de TE 10mM
- Agregar 150  $\mu$ L de acetato de sodio 4M (pH 6), mezclar y mantener a  $-20^{\circ}\text{C}$  por una hora
- Centrifugar a 13,500 rpm por 10 minutos y pasar el sobrenadante a un tubo limpio
- Agregar 1 volumen de isopropanol y precipitar en hielo por 10 minutos
- Centrifugar a 13,500 rpm por 10 minutos y eliminar todo el sobrenadante
- Resuspender en un volumen adecuado de TE 10mM
- Agregar RNAsa e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 horas
- Extraer con 1 volumen de fenol-cloroformo
- Precipitar con 0.1 volumen de acetato de sodio 3M y 1 volumen de isopropanol por 10 minutos
- Centrifugar a 5 000 rpm por 5 minutos y retirar el sobrenadante
- Resuspender en un volumen pequeño de TE 10mM

## 9. Transformación de *Pseudomonas aeruginosa* por electroporación

- Crecer un precultivo de *P. aeruginosa* en medio SOB a 37°C por 12 horas
- Centrifugar 1.5 mL en un tubo de polipropileno a 5 500 rpm por 5 minutos
- Descartar el sobrenadante y lavar 2 veces con 1 mL de sacarosa 10%
- Resuspender la pastilla de células en 50 µL y pasarlas a un tubo limpio
- Agregar 2 µL de DNA plasmídico y mezclar con micropipeta
- Transferir la mezcla a una celda de electroporación mantenida en hielo
- Dar un pulso en el electroporador de 1.6 kV
- Agregar 1 mL de medio YT2X y mezclar con micropipeta
- Pasar la mezcla a un tubo de ensaye e incubar a 37°C por 2 horas
- Centrifugar a 6 000 rpm por 10 minutos y resuspender en 300 µL de medio YT2X
- Hacer diluciones e inocular 100 µL de cada una en cajas con medio LB suplementadas con el antibiótico requerido
- Incubar a 37°C por 12 horas

## 10. Reacciones de ligación

- Cuantificar la concentración de vector e inserto digeridos y calcular el peso molar de cada uno de ellos
- Calcular los volúmenes de vector e inserto necesarios para obtener una relación 1:5 de peso molar
- Adicionar:

Buffer ligasa 5X            3  $\mu$ L

Vector digerido            Volumen calculado

Inserto digerido            Volumen calculado

Ligasa HC 5 U/  $\mu$ L            1  $\mu$ L

Agua estéril                Aforar hasta 15  $\mu$ L

Dejar incubando la reacción a temperatura ambiente durante 12 horas

## REFERENCIAS

- Abdel-Mawgoud, A.M., F. Lépine and E. Déziel. (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**:1323-1336
- Bever, R.A., and B.H. Iglewski. (1988) Molecular characterization and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* elastase structural gene. *Journal of Bacteriology* **170**:4309-4314
- Budzik, J.M., W.A. Rosche, A. Rietsch and G.A. O'Toole. (2004) Isolation and characterization of a generalized transducing phage for *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14. *Journal of Bacteriology* **186**(10):3270-3273
- Byrne, M. and A.M. Kropinski. (2005) The genome of the *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing bacteriophage F116. *Gene* **346**:187-194
- Chaudhary, V.K., Y. Jinno, D. FitzGerald and I. Pastán. (1990) *Pseudomonas* exotoxin contains a specific sequence at the carboxyl terminus that is required for cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **87**:308-312
- Chrzanowski, L., L. Lawniczak and K. Czaczyk. (2012) Why do microorganisms produce rhamnolipids? *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**:401-419
- De Kievit, T.R. (2009) Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* **11**(2):279-288
- Dusane, D.H., S.S. Zinjarde, V.P. Venugopalan, R.J.C. McLean, M.M. Weber & P.K.S.M. Rahman. (2010) Quorum sensing: implications on Rhamnolipid biosurfactant production. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* **27**:159-184
- Forgac, M. (2000) Structure, mechanism and regulation of the clathrin-coated vesicle and yeast vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. *The Journal of Experimental Biology* **203**:71-80
- Galloway, D.R. (1991) *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Molecular Biology* **5**(10): 2315-2321
- González-Cerón, G., O.J. Miranda-Olivares and L. Servín-González. (2009) Characterization of the methyl-specific restriction system of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and of the role played by laterally acquired nucleases. *Federation of European Microbiological Societies* **301**:35-43
- Grant, S.G.N., J. Jessee, F.R. Bloom and D. Hanahan (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **87**:4645-4649

- Griffiths, A.J.F., J.H. Miller, D.T. Suzuki, et al. An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21766/> (Fecha de acceso: 22/02/2016)
- Grosso-Becerra, M.V., C. Santos-Medellín, A. González-Valdez, J.L. Méndez, G. Delgado, R. Morales-Espinosa, L. Servín-González, L.D. Alcaraz and G. Soberón-Chávez. (2014) *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *Biomedical Central Genomics* **15**:318
- Holloway, B.W., J.B. Egan and M. Monk. (1961) Lysogeny in *Pseudomonas aeruginosa*. *Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science* **38**:321-330
- Ikedo, H. and J. Tomizawa. (1965) Transducing fragments in generalized transduction by phage P1. *Journal of Molecular Biology*. **14**:85-109
- Jacobs, M.A., A. Alwood, I. Thaipisuttikul, D. Spencer, E. Haugen, S. Ernst, O. Will, R. Kaul, C. Raymond, R. Levy, L. Chun-Rong, D. Guenther, D. Bovee, M.V. Olson and C. Manoil. (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **100(24)**:14339-14344
- Jarrell, K. & A.M. Kropinski (1977) Identification of the cell wall receptor for bacteriophage E79 in *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO. *Journal of Virology* **23(3)**:461-466
- Kounnas, M.Z., R.E. Morris, M.R. Thompson, D.J. FitzGerald, D.K. Strickland and C.B. Saelinger. (1992) The  $\alpha_2$ -macroglobulin receptor/ low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes *Pseudomonas* exotoxin A. *The Journal of Biological Chemistry* **267(18)**:12420-12423
- Krishnapillai, V. (1971) A novel transduction phage. Its role in recognition of a possible new host-controlled modification system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular and General Genetics* **114**:134-143
- Kwon, D.H. and C.D. Lu. (2006) Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50(5)**:1615-1622
- Lambert, P.A. (2002) Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine* **41(95)**:22-26
- Lau, G. W., D.J. Hassett, H. Ran and F. Kong. (2004) The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine Reviews* **10(12)**:599-606
- Lesic B. and L.G. Rahme. (2008) Use of the lambda Red recombinase system to rapidly generate mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomedical Central Molecular Biology* **9(1)**:20
- Liu, P.V. (1974) Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Infectious Diseases* **130**:S94-S99

- Maier, R.M. and G. Soberón-Chávez. (2000) *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **54**:625-633
- Manwar, A.V., S.R. Khandelwal, B.L. Chaudhari, J.M. Meyer and S.B. Chincholkar. (2003) Siderophore production by a marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **118**:243-251
- Martínez, A. and G. Soberón-Chávez. (2001) Characterization of the lipA gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain IGB83. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**:731-735
- Mavrodi, D.V., R.F. Bonsall, S.M. Delaney, M.J. Soule, G. Phillips and L.S. Thomashow. (2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* **183(21)**:6454-6465
- Miller, R.V., J.M. Pemberton and A.J. Clark. (1977) Prophage F116: Evidence for extrachromosomal location in *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO. *Journal of Virology* **22(3)**:844-847
- Morgan, A.F. (1979) Transduction of *Pseudomonas aeruginosa* with a mutant of bacteriophage E79. *Journal of Bacteriology* **139(1)**:137-140
- Morihara, K., H. Tsuzuki, T. Oka, H. Inoue and M. Ebata. (1965) *Pseudomonas aeruginosa* elastase: isolation, crystallization, and preliminary characterization. *Journal of Biological Chemistry* **240**:3295-3304
- Morrison, W.D., R.V. Miller and G.S. Saylor. (1979) Frequency of F116-mediated transduction of *Pseudomonas aeruginosa* in a freshwater environment. *Applied and Environmental Microbiology* **36(5)**:724-730
- Müller, M. (2002) Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radical Biology and Medicine* **33(11)**:1527-1533
- Müller, M.M., and R. Hausmann (2011) Regulatory and metabolic network of rhamnolipid biosynthesis: traditional and advanced engineering towards biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **91**:251-264
- Nadal-Jiménez, P., G. Koch, J.A. Thompson, K.B. Xavier, R.H. Cool and W.J. Quax. (2012) The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **76(1)**:46-65
- Nitschke, M., S.G.V.A.O. Costa and J. Contiero. (2005) Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnology Progress* **21**:1593-1600
- Nitschke, M., S.G.V.A.O. Costa and J. Contiero. (2011) Rhamnolipids and PHAs: recent reports on *Pseudomonas*- derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochemistry* **46**:621-630

- O'Malley, Y.Q., M.Y. Abdalla, M.L. McCormick, K.J. Reszka, G.M. Denning and B.E. Britigan (2002) Subcellular localization of *Pseudomonas* pyocyanin cytotoxicity in human lung epithelial cells. *American Journal Physiology Lung Cell Molecular Physiology* **284**:L420-L430
- O'Malley, Y.Q., K.J. Reszka, G.T. Rasmussen, M.Y. Abdalla, G.M. Denning and B.E. Britigan. (2003) The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *American Journal Cellular Molecular Physiology* **285**:L1077-L1086
- Pemberton, J.M. (1973) F116: a DNA bacteriophage specific of the pili of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO. *Virology* **55(2)**:558-560
- Quandt, J. and M.F. Hynes. (1993) Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene* **127**:15-21
- Reis, R.S., A.G. Pereira, B.C. Neves and D.M.G. Freire. (2011) Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*- A review. *Bioresource Technology* **102**: 6377-6384
- Rutherford, S.T. and B.L. Bassler. (2012) Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2**:a012427
- Sakharkar, Meena K., P. Jayaman, W. Mar Soe, V.T.K. Chow, L. Chu Sing and K.R. Sakharkar. (2009) In vitro combinations of antibiotics and phytochemicals against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbiology Immunology Infections* **42**: 364-370
- Sambrook, J. and D.W. Russell. Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 2001
- Slayter, H.S., B.W. Holloway and C.E. Hall. (1964) The structure of *Pseudomonas aeruginosa* phage B3, E79 and F116. *Journal of Ultrastructure Research* **11**:274-281
- Smith, D.C., R.A. Spooner, P.D. Watson, J.L. Murray, T.W. Hodge, M. Amessou, L. Johannes, J.M. Lord and L.M. Roberts. (2006) Internalized *Pseudomonas* exotoxin A can exploit multiple pathways to reach the endoplasmic reticulum. *Traffic* **7**:379-393
- Soberón-Chávez, G., F. Lépine and E. Déziel. (2005) Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**: 718-725
- Stover, C.K., X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, P. Warrenner, M.J. Hickey, F.S.L. Brinkman, W.O. Hufnagle, D.J. Kowalik, M. Lagrou, R.L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L.L. Brody, S.N. Coulter, K.R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G.K.-S. Wong, Z. Wu, I.T. Paulsenk, J. Reizer, M.H. Saier, R.E.W. Hancock, S.Lory and M.V. Olson. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959-964

- Thayer, M.M., K.M. Flaherty and D.B. McKay. (1991) Three-dimensional structure of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* at 1.5-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry* **266**(5):2864-2871
- Toribio, J., A.E. Escalante & G. Soberón-Chávez. (2010) Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Lipid Science and Technology* **112**:1082-1087
- Wedekind, J.E., C.B. Trame, M. Dorywalska, P. Koehl, T.M. Raschke, M. McKee, D. FitzGerald, R.J. Collier and D.B. McKay. (2001) Refined crystallographic structure of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and its implications for the molecular mechanism of toxicity. *Journal of Molecular Biology* **314**:823-837
- Wild, M., A.D. Caro, A.L. Hernández, R.M. Miller and G. Soberón-Chávez. (1997) Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* monorhamnolipid deficient mutant. *FEMS Microbiology Letters* **153**:279-285
- Winsor, G.L., D.K. Lam, L. Fleming, R. Lo, M.D. Whiteside, N.Y. Yu, R.E. Hancock, F.S. Brinkman. (2011) *Pseudomonas* Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for *Pseudomonas* genomes. *Nucleic Acids Research* **39**:D596-D600
- Wolf, P. and U. Elsässer-Beile. (2009) *Pseudomonas* exotoxin A: From virulence factor to anti-cancer agent. *International Journal of Medical Microbiology* **299**:161-176
- Wretling, B. and O.R. Pavlovskis. (1983) *Pseudomonas aeruginosa* elastase and its role in *Pseudomonas* infections. *Reviews of Infectious Diseases* **5**(5):S998-S1004
- Yoon, S.S., R.F. Hennigan, G.M. Hilliard, U.A. Ochsner, K. Parvatiyar, M.C. Kamani, H.L. Allen, T.R. De Kievit, P.R. Gardner, U. Schwab, J.J. Rowe, B.H. Iglewski, T.R. McDermott, R.P. Mason, D.J. Wozniak, R.E.W. Hancock, M.R. Parsek, T.L. Noah, R.C. Boucher and D.J. Hassett. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Developmental Cell* **3**:593-603