

“QUORUM SENSING” Y VIRULENCIA EN *Pseudomonas aeruginosa* (Revisión)

Arráiz, N.¹

¹. Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
E-mail: narraiz@cantv.net

Recibido: 28-05-2001. Aceptado: 04-08-2001.

Introducción

En los últimos años ha crecido el interés en el estudio de la comunicación intercelular bacteriana y se han identificado mecanismos regulatorios de la expresión de ciertos genes en respuesta a altas densidades celulares ([22,31](#)). El comportamiento “social” de las bacterias está emergiendo como un modelo integral regulatorio que capacita a estos organismos para enfrentar diversas condiciones de estrés ambiental, lo cual cobra gran importancia en el caso particular de bacterias patógenas creciendo en tejidos de un hospedador.

La comunicación intercelular funciona tanto en bacterias gram-positivas, a través de péptidos, como en gram-negativas, mediada por unas moléculas aciladas conocidas como autoinductores ([22](#)). La autoinducción define un sistema sensor ambiental que permite a la bacteria monitorear su propia densidad celular, de allí que se ha acuñado el término “Quorum sensing” ([9,11](#)) para este sistema de regulación. La célula bacteriana produce un componente difusible denominado autoinductor (AI), el cual se acumula progresivamente en el medio de crecimiento. Cuando la densidad celular es alta, el autoinductor alcanza alta concentración intracelular y mediante interacción con activadores transcripcionales, promueven la expresión de un grupo de genes para regular una gran variedad de respuestas fisiológicas. La concentración de autoinductores incrementa precisamente porque hay mayor población bacteriana produciendo la señal. El sistema de comunicación mejor estudiado es mediado por los autoinductores conocidos como acil-homoserín lactonas (acil-HSL), unas moléculas de señalización sintetizadas por enzimas específicas que utilizan como sustrato S-adenosilmetionina y un intermediario de la ruta biosintética de ácidos

grasos (1,2,7,19,22,31).

En la Figura 1 se muestra un núcleo homoserín lactona, al cual, a través del grupo amino, se agregan cadenas aciladas de 4 a 16 carbonos, algunas con insaturaciones y con sustituciones que incluyen grupos hidroxilo o carbonilo. La longitud de estas cadenas laterales, el grado de insaturación, así como sustituciones sobre esta cadena proveen especificidad a la señal (11,31).

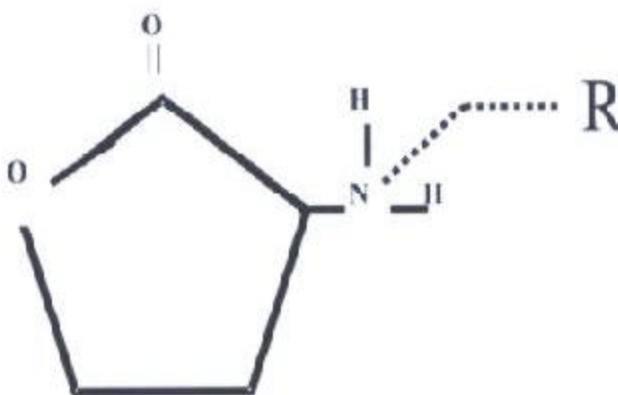


Figura 1. Estructura básica de la Homoserín lactona. Al grupo NH₂ se unen cadenas aciladas (R). Ver detalles en el texto.

Uno de los ejemplos mejor caracterizados de esta comunicación entre bacterias es el mecanismo de autoinducción de luminiscencia en la bacteria marina *Vibrio fischeri*. El autoinductor de luminiscencia de *V. fischeri*, designado VAI ("vibrio autoinductor") es el 3-Oxo-N-(tetrahidro-2-oxo-3-furanil) hexanamida o comúnmente llamado N-3-(oxohexanoil) homoserín lactona. A baja densidad celular, VAI difunde pasivamente al medio extracelular, a favor de un gradiente, mientras que a alta densidad celular, VAI se acumula en la célula y alcanza una concentración intracelular equivalente a la concentración extracelular (Figura 2) (7). *V. fischeri* puede encontrarse en forma de vida libre, o en simbiosis, habitando la luz de órganos de peces marinos y calamares. La forma de vida libre, como es de esperar, se encuentra a muy baja densidad celular, en el orden de 10^2 células/ml y no es luminiscente. En la luz de los órganos, alcanza densidades de 10^{10} células/ml hasta 10^{11} células/ml, por lo cual se activa el sistema de autoinducción y se expresan los genes de

luminiscencia (7,22).

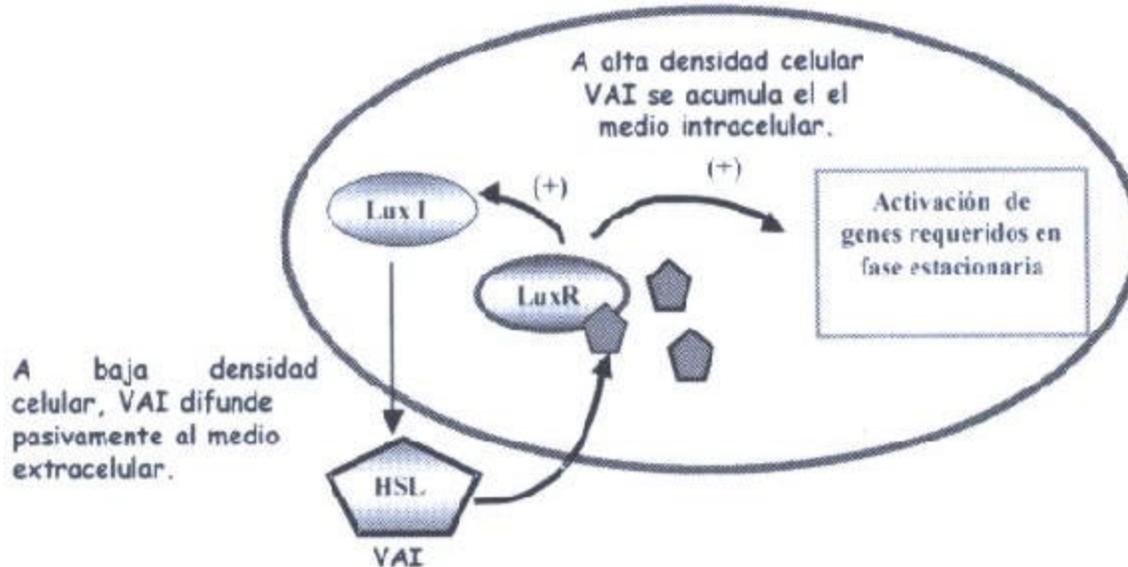


Figura 2. Modelo propuesto para la regulación de la expresión de genes por autoinductores a altas densidades celulares, basado en sistema *V. fischeri*. LuxR, producto del gen *luxR*, es un activador transcripcional que estimula la síntesis de genes de luminiscencia y del gen *luxI* codifica la proteína LuxI, que es la autoinductora sintetasa de VAI. VAI: es el autoinductor 3-Oxo-hexanoil-homo-serin lactona específico de *V. fischeri*.

Los genes de luminiscencia están organizados en dos unidades de transcripción divergentes con los sitios "start", separados por 150 pares de bases (Figura 3). El gen *luxR* codifica la proteína LuxR, el cual es el activador transcripcional de genes de luminiscencia y en presencia de VAI, se une a una secuencia con simetría diada localizada aproximadamente a -40 pares de bases "upstream" (caja *luxR*) del operón de luminiscencia: *luxICDABEG* (6). El primer gen de este operón, *luxI*, codifica para la proteína VAI sintetasa (193 aa) responsable de la síntesis de VAI. A baja densidad celular, *luxI* se transcribe a nivel basal y VAI se acumula lentamente en el medio de crecimiento. Cuando VAI alcanza concentraciones críticas en el medio intracelular (a alta densidad celular), interactúa con LuxR; este complejo se une a la "caja *lux*" y activa la transcripción de genes de luminiscencia y su propia transcripción. Esto genera un esquema autorregulatorio positivo dependiendo de las concentraciones de VAI (28) (Figura 3). Los otros genes del operón codifican para componentes del

sistema de luminiscencia.

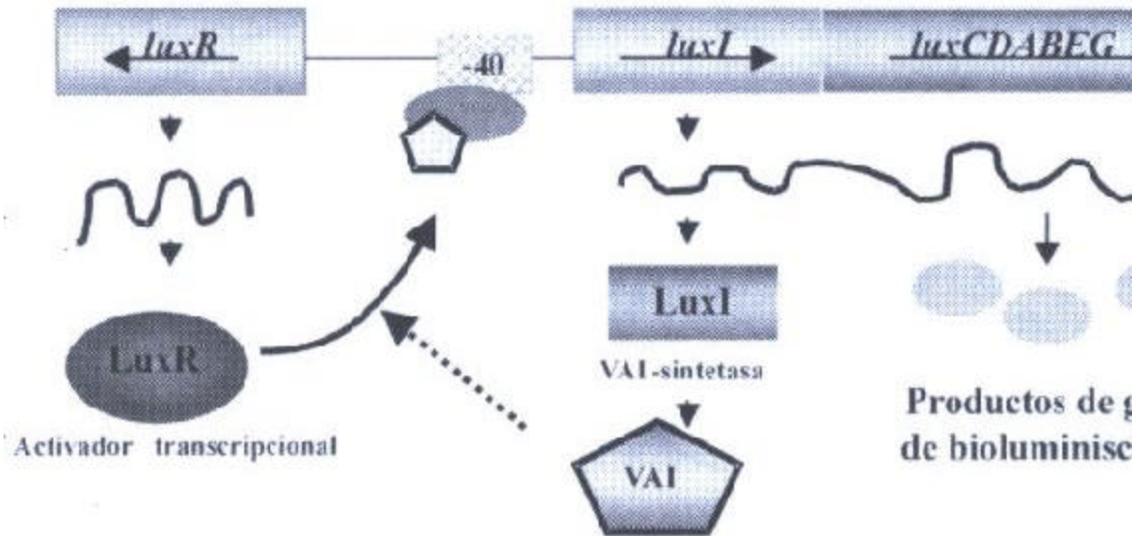


Figura 3. Organización del operón de luminiscencia de *V. fischeri* y esquema de autoinducción mediado por productos génicos del locus *luxR*. El complejo LuxR-VAI se une a región reguladora activa tanto su propia transcripción como la de los genes *luxI*, que codifican VAI sintetasa y genes *luxCDABEG*, codificando proteínas de bioluminiscencia.

Durante muchos años se pensó que el fenómeno de autoinducción estaba confinado a los *vibrios* marinos luminiscentes, sin embargo, actualmente se sabe que muchas bacterias no luminiscentes utilizan sistemas de regulación homólogos, para controlar una gran variedad de funciones de una manera dependiente de la densidad celular (1,2,8,9,10,11,18,19,20,27, 31,36,39,44,45). Aunque la mayor parte del conocimiento sobre estos reguladores se ha obtenido usando sistemas LuxR-LuxI, estudios recientes han reportado un número creciente de bacterias gram-negativas que tienen genes similares a *luxR* o a *luxI* (Tabla 1). Fuqua y cols. (11) han designado el grupo de homólogos de LuxR como miembros de una superfamilia: superfamilia LuxR. Este grupo de proteínas exhiben gran homología principalmente en la región carboxi-terminal (Figura 4). En general, opera el mecanismo descrito para el sistema de *V. fischeri*, donde el homólogo de LuxR es el activador transcripcional, que estimula la transcripción del gen que codifica para un autoinductor sintetasa (homólogo de *luxI*) y en consecuencia, se expresan genes requeridos a altas densidades celulares (Tabla 1). A través de observaciones de síntesis enzimática de moléculas

kasmera-completa

autoinductoras, se ha propuesto que las proteínas tipo LuxI utilizan como sustratos el grupo homoserín lactona derivado de S-adenosilmetionina (intermediario en la ruta biosintética de treonina y metionina) y cadenas aciladas en complejos con proteínas transportadoras, derivadas de intermediarios en la biosíntesis de ácidos grasos (9). Es importante aclarar que el análisis de productos generados de la actividad de homólogos de LuxI expresado tanto en la bacteria de origen, como en sistemas heterólogos, como *E. coli*, rinden bajos niveles de síntesis de otras homoserín lactonas aciladas, estructuralmente diferentes a los autoinductores principales. No se sabe si estos productos menores se deben a especificidad limitada del sustrato sobre la maquinaria biosintética o a modificaciones del autoinductor principal después de su síntesis (9).

Tabla 1
Sistemas Regulatorios "Quorum sensing" en diversos géneros b

Especie bacteriana	Moléculas señal	Proteínas Regulatorias	Genes que regula/ Función
<i>Vibrio fischeri</i>	N-3-(oxohexanoyl)-homoserin lactona (VAI-1)	LuxI/LuxR	<i>luxCDABEG, luxRI</i> luminiscencia.
	N-(octanoyl)-L-homoserin lactona (VAI-2)	AinS/AinR	<i>luxCDABEG, ?</i>
<i>Vibrio harveyi</i>	N-(hidroxibutiril)-L-homoserin lactona (HAI-1)	LuxM/LuxN- LuxO-LuxR	<i>luxCDABEG, luminiscencia y síntesis de hidroxibutirato</i>
	HAI-2	Lux?/LuxPQ- LuxO-LuxR	<i>luxCDABEG</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserin lactona (PAI-1)	LasI/LasR	<i>lasB, lasA, aprA, toxA</i> factores de virulencia
	N-(butiril)-L-homoserin lactona (PAI-2)	RhlI/RhlR	<i>rhlAB</i> síntesis de ramnolípidos, factores de virulencia
<i>Pseudonas aureofaciens</i>	(PRAI)	PhzI/PhzR	<i>phz</i> biosíntesis de fenazina
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	N-3-(oxooctanoyl)-L-homoserin lactona (AAI)	TraI/TraR TraM	Genes <i>tra, traR</i> transferencia plásmido T1
<i>Erwinia carotovora subsp. carotovora SCR1193</i>	VAI-1	ExpI/ExpR	<i>pef, pec, pep</i> síntesis exoenzimas
	VAI-1	CarI/CarR	<i>cap</i> síntesis de antibióticos carbapenem
<i>Erwinia carotovora subsp. carotovora SCC3193</i>	VAI-1	HsII/?	<i>pef, pec, pep</i> síntesis exoenzimas
<i>Erwinia stewartii</i>			Genes <i>wts</i> Síntesis exopolisacáridas factores de virulencia
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	N-(3R-hidroxi-7-cis-tetradecanoyl)-L-homoserin lactona, bacteriocina pequeña (RLAI)	¿RhlR	<i>rhlABC</i> genes rizosfera y fase estacionaria
<i>Enterobacter agglomerans</i>	VAI-1	EagI/EaR	Función no clara
<i>Yersinia enterocolitica</i>	VAI-1	YenI/YenR	Función no clara
		SwrI/?	Modificado "Quorum"

kasmera-completa

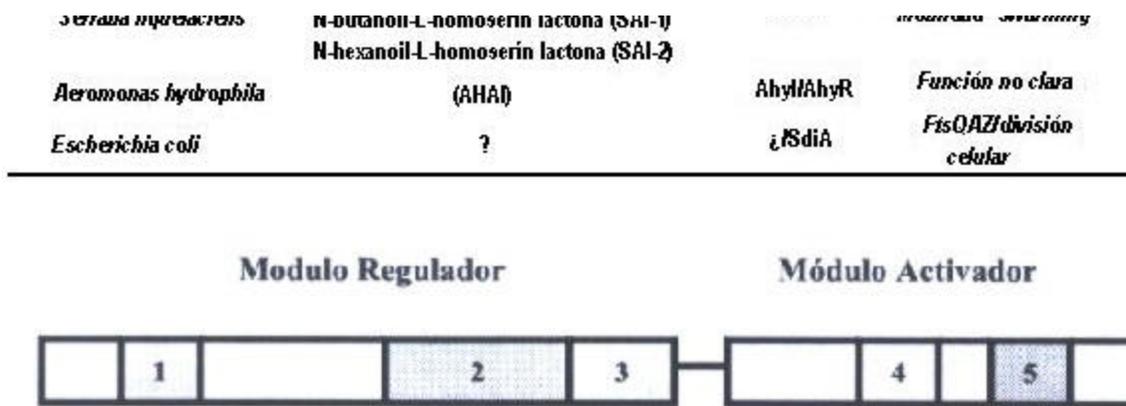


Figura 4. Diagrama esquemático de regiones de las proteínas de la superfamilia LuxR. En el regulador se distinguen: 1: región de autorregulación de LuxR, requerida para el control de LuxR; 2: región de unión de autoinductor; 3: región de multimerización. En el módulo activador reconocen 2 subregiones. 4: dominio HTH de unión al DNA; 5: región C-terminal requerida para activación transcripcional. Las funciones han sido mapeadas por análisis de mutaciones y deleciones.

Los sistemas regulatorios tipo LuxR-LuxI presentan diversos tipos de organización genética. Generalmente están organizados en unidades transcripcionales próximas, donde algunos pares de genes homólogos se transcriben convergentemente y no están ligados a los genes que regulan. Estos incluyen los genes *expR* y *expl* de *E. carotovora* (21); *phzR* y *phzI* de *P. aureofaciens* (45); *yenR* y *yenI* de *Y. enterocolitica* (39,44) y los genes *esaR* y *esaI* de *E. stewartii* (2). Hay también ejemplos de pares de genes transcritos en la misma dirección, incluyendo los genes *lasR* y *lasI* y *rhIR* y *rhII* de *P. aeruginosa*, aunque no estén expresados como un simple operon (25,26, 29, 32,33).

En contraste con estos ejemplos, los genes *traR* y *traI* de *A. tumefaciens* están separados por más de 60 pb en plásmidos T1 tipo octopinA y 30 Kpb en plásmidos T1 tipo nopalinA (10, 19,20,36).

Caracterización de sistemas “Quorum sensing” en *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista de importancia clínica, asociado a diversas patologías principalmente en pacientes inmunocomprometidos y es uno de los principales agentes causales de

infecciones intrahospitalarias. Entre las patologías asociadas a esta bacteria se encuentran: infecciones crónicas pulmonares en pacientes con fibrosis quística, complicaciones infecciosas de heridas y quemaduras, infección en pacientes con otitis externa, infecciones en piel, ojos, tracto genito-urinario e infecciones sistémicas generalizadas (3,37,14,31). El éxito de esta bacteria para causar infección reside en su capacidad para sintetizar y secretar una variedad de exoproductos, tales como exotoxina A, fosfolipasas, sideroporos y varias proteasas con una amplia especificidad de sustratos que incluyen elastina, colágeno, transferrina e inmunoglobulinas encontrados en tejidos del hospedador (3). Estos productos no se producen constitutivamente, sino que son regulados por diversos estímulos. En los últimos años ha crecido el interés en el estudio de la regulación de estos exoproductos, principalmente en respuesta a altas densidades celulares, sobre todo después del descubrimiento de que existen al menos dos sistemas "quorum sensing" que regulan la expresión de genes de virulencia en *P. aeruginosa*. La regulación de genes de virulencia dependiente de la densidad celular es una estrategia clave, debido a que tal vez se requiere una masa celular muy alta que sea capaz de sintetizar factores de virulencia en cantidad suficiente para ejercer un efecto significativo sobre los tejidos del hospedador, e inclusive contrarrestar la respuesta inmune del mismo. A continuación se presentan los principales reportes que han permitido definir algunas características regulatorias de los sistemas "quorum sensing" de *P. aeruginosa*.

Sistema "Quorum sensing" LasI/LasR

En 1992, Bainton y cols. (1) construyeron un sistema sensor de homoserín lactonas. El sistema consistía en un plásmido donde fueron clonados los genes *luxR* y región promotora del operón *lux* de *V. fischeri* (o *Photobacterium fischeri*), unidos a genes *luxA* y *luxB* (luciferasa) de *V. harveyi*. Cuando el plásmido se introducía en *E. coli*, esta bacteria emitiría luminiscencia, solo si se suministraba N-3(oxo-hexanoil)-homoserín lactona (OHHL) exógena, debido a que esta construcción carecía de *luxI*, es decir la homoserín lactona sintetasa. Entonces cuando *E. coli* transformada con este sistema, se incubaba con sobrenadantes de cultivos, la luminiscencia indica la presencia de OHHL u otra N-acil-homoserín-lactona relacionada (Figura 5). Varias especies de *P. aeruginosa* inducían

luminiscencia con este sistema, sugiriendo regulación por autoinducción en *Pseudomonas* (1).

Previamente Gambello e Iglewski (12) habían reportado un homólogo de *luxR* en *P. aeruginosa*, aislado a través de un análisis de complementación de producción de elastasa en la cepa PA103. Esta cepa mutante espontánea tenía el gen estructural *lasB* (elastasa) intacto, pero era defectuosa en la producción de la enzima. Los autores introdujeron una genoteca de una cepa silvestre en la mutante PA103 y aislaron el fragmento que restauraba la producción de elastasa. La secuencia de aminoácidos predicha para este gen, mostró homología con LuxR, por lo cual fue designado *lasR*, por "regulator of *lasB*" (12), siendo actualmente uno de los miembros mejor caracterizados de la superfamilia LuxR.

El papel regulatorio de LasR (26,618 Kd) sobre genes de elastasa *lasB* fue confirmado en una mutante de delección de *lasR* en la cepa de referencia PAO1, en la cual no se detectaba proteína elastasa ni RNAm de *lasB* (12). Mas tarde, el grupo de Gambello, utilizando la misma mutante de delección PAO-R1, reportó que LasR regulaba la expresión del gen *lasA*, codificante de otra elastasa (40).

Debido a que LasR regulaba la transcripción de dos proteasas *lasA* y *lasB* asociadas con virulencia, el grupo de Gambello siguió investigando la posibilidad de que esta proteína activadora regulara otros exoproductos de virulencia en *P. aeruginosa*. Efectivamente, la transcripción del gen *apr*, que codifica una proteasa alcalina, se anulaba en la cepa mutante PAO-R1 (*lasR*) y se restauraba cuando el gen *lasR* se suministraba sobre un plásmido multicopia (13). Además, la mutante *lasR* también exhibió una disminución de un 40% en la expresión del gen *toxA*, codificante de exotoxina A. De hecho, hay similitud de secuencias en las regiones promotoras de los genes regulados por LasR, con una secuencia de 29 nucleótidos con simetría diada inmediatamente precediendo el hexámero -35 de los genes *lasB*, *lasA* y *apr*.

Posteriormente se identificó un gen homólogo a *luxI*, el gen *lasI*, localizado después de *lasR* (32). Cuando *lasI* se introduce en *E. coli* sobre un plásmido multicopia, dirige la síntesis de oxododecanoil-L-homoserina lactona (OdDHL, Figura 5 y Tabla 1).

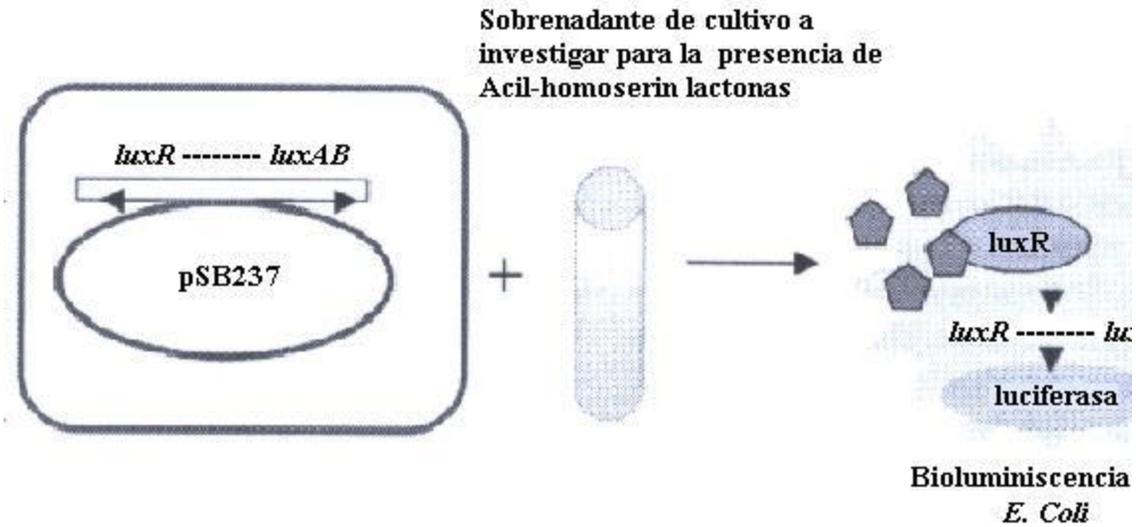


Figura 5. Representación esquemática del ensayo de bioluminiscencia desarrollado en *E. coli* plásmido reportero pSB237, en el cual se clonó el general luxR, región promotora de lux y gen codifican respectivamente las subunidades α y β de la enzima luciferasa.

El papel de un sistema "quorum sensing" en la regulación de exoproductos asociados con virulencia en *P. aeruginosa*, dirigió el interés a la caracterización genética de diferentes mutantes defectuosas en la síntesis de dichos exoproductos, lo cual condujo a la identificación de un segundo sistema "Quorum sensing" en este patógeno oportunista.

Sistema "Quorum sensing" RhII/RhIR

Koch y cols. (24) aislaron una mutante tn5-Gm^r (65E12) afectada en la biosíntesis de ramnolípidos y elastasa. La mutante no crecía en medio mínimo conteniendo hexadecano como única fuente de carbono. Solo crecía si se añadía ramnolípidos al medio, indicando que éstos juegan un papel importante en la solubilización y captura de sustancias insolubles en agua. Ochsner y cols. (30) utilizaron esta mutante para estudios de complementación con una genoteca de cósmidos y lograron aislar y caracterizar un fragmento de DNA capaz de restaurar la producción de ramnolípidos y elastasa. Identificaron un gen, designado *rhIR*, cuyo producto mostraba homología con los activadores transcripcionales LasR de *P. aeruginosa*, RhIR de *Rhizobium leguminosarum* y LuxR de *V. fischeri*.

La existencia de este segundo sistema "quorum sensing" en *P. aeruginosa* fue

kasmera-completa

confirmada independientemente por Latifi y cols., (25), quienes estaban caracterizando otra mutante de *P. aeruginosa* defectuosa en la producción de elastasa. Utilizaron una mutante elastasa negativa de PAO1, denominada PANO67 que había sido obtenida por Jones y cols. usando N-metil-N-nitro-N-nitroso guanidina (21). La mutante PANO67 tenía efectos pleiotrópicos y no sintetizaba la mayoría de exoproductos. En la tabla 2 se resumen los resultados obtenidos por “inmunoblotting” y ensayos enzimáticos en las cepas PAO1 silvestre y mutante pleiotrópica PANO67. Se pensaba que PANO67 podría tener una mutación en los genes *lasR* o *lasI*, de acuerdo a la información disponible hasta ese momento.

La mutante no inducía la producción del pigmento violáceo en el sistema sensor de homoserín lactonas de la cepa mutante *C. violaceum* CV026. La bacteria Gram-negativa *Chromobacterium violaceum*, encontrada comúnmente en agua y suelo, produce un pigmento púrpura (violaceína), cuya expresión depende del autoinductor N-hexanoil-L-homoserín lactona (HHL) expresado en la cepa *C. violaceum* silvestre. Este autoinductor no se expresa en la cepa mutante CV026 (mini-Tn5), por lo cual es violaceína negativa. La producción del pigmento puede restaurarse en esta mutante por incubación con sobrenadantes de cultivo de la cepa silvestre o de otras bacterias que produzcan homoserín lactonas relacionadas. Este sistema, al igual que el sistema reportero *luxR-luxAB* de *V. fischeri*, permite detectar un amplio rango de homoserín lactonas (27,42).

Al transformar la cepa mutante PANO67 con una genoteca genómica de PAO1 (silvestre) y analizar restauración de síntesis de exoproductos, aislaron un cósmido de complementación (Tabla 2). Pensaron que el cósmido incluía los genes *lasR* o *lasI*, por lo cual utilizaron como sonda estos genes en un “Southern blotting” de DNA de este cósmido, pero no observaron hibridización, indicando que estos genes no eran responsables de la restauración del fenotipo y en consecuencia, no eran los genes afectados en la mutante.

Tabla 2
Síntesis de exoproductos en cepa mutante pleiotrópica PAN067

Exoproducto	PAO1	PAN067	PAN067 (pAX27)	PAN067 (prh1RI)	PAN067 (prh1E)
Elastasa	+	-	+	+	+
Proteasa alcalina	+	-	+	+	+
Exotoxina A	+	+/-	+	NT	NT
Hemolisina	+	+/-	+	+	NT
Cianida	+	-	+	+	+
Piocianina	+	-	+	+	+
Inductor (C.V.)	+	-	+	++	+

PAO 1: cepa silvestre; PAN067 es la murante de efectos pleiotrópicos. Se estudió la síntesis de exoproductos en PAN067 transformada con: pAX27 (20 Kb): es el cósmido aislado por complementación; los tres últimos son plásmidos recombinantes con fragmentos aislados (subgenoteca). prh1RI: fragmento pstI de 2Kb conteniendo rhlR y rhlI; fragmento de 1.4 Kb conteniendo el gen rhlR. NT: No ensayado en *C. violaceum*.

Luego, hicieron una subgenoteca de este cósmido y delimitaron un fragmento PstI de 2Kb que tenía la actividad de complementación (síntesis de exoproductos) y era capaz de dirigir la síntesis de autoinductor. Este fragmento fue designado *vsm* por "virulence and secondary metabolism". Al secuenciar este fragmento, encontraron dos marcos de lecturas. Uno de ellos, designado *VsmR* (726 pb) que resultó 90% idéntico a la secuencia del producto del gen *RhlR* reportada por Ochsner y cols. (30) como un activador transcripcional de la síntesis de ramnolípidos, elastasa y piocianina.

El segundo marco de lectura, designado *VsmI* o *RhII* mostró homología de secuencia con *LuxI*, *LasI* y otros productos responsables de la síntesis de autoinductor. Efectivamente, *RhII* dirige la síntesis de otros autoinductores *N*-butanoil-L-homoserina lactona (BHL o PAI-2) y *N*-hexanoil-L-homoserina lactona (HHL), en menor proporción (4,29, 33,41). Además, precediendo *vsmI* (posición -46), localizaron un elemento palindrómico tipo "caja lux".

En la Tabla 2 se resumen los resultados del análisis de complementación de la

cepa PANO67. Cuando la cepa es transformada con los genes *rhIRI*, se restaura su capacidad de síntesis de exoproductos y de autoinductor.

Previamente se había reportado que las mutantes *lasR* son deficientes en la producción de elastasa (12), sin embargo, la mutante PANO67 aunque es deficiente en elastasa, tiene un sistema *lasR/lasI* funcional, ya que produce OdDHL (25). Como ambos sistemas, *lasR/lasI* y *rhIR/rhII* están involucrados en la regulación de exoproductos, parecía posible que los dos sistemas regularan, de manera interactiva, genes blancos estructurales como es el caso de *lasB*. También se observaba la identidad de las cajas tipo "lux" precediendo cada gen, *lasI* o *rhII*.

Para estudiar la posibilidad de que *lasR*/OdDHL activara la transcripción de *rhl* o alternativamente que *rhl*/BHL regulara a *lasR*, Latifi y cols. (26), construyeron fusiones transcripcionales de estos genes al gen *lacZ'* y estudiaron la expresión de estas fusiones en mutantes *lasR* (PAOR) o *rhl* (PANO67). Luego suministraban los genes correspondientes en sobre plásmidos multicopia para ensayos de complementación.

Los autores observaron la misma actividad promotora *lasR* en la cepa silvestre PAO1 y en las mutantes PAOR (*lasR*) o mutante PANO67 de efectos pleiotrópicos, la cual se sabía que podía ser complementada por *rhIIIRI*. Cuando la fusión fué expresada en el sistema heterólogo de *E. coli*, la presencia de *lasR* suministrada en multicopia, reducía marcadamente la expresión de *lasR-lacZ*. El efecto fue mas pronunciado en ausencia del autoinductor. Esto sugirió un efecto regulador negativo y que LasR estaba reconociendo elementos regulatorios sobre *lasR*, pero esta regulación no es muy clara.

Para determinar si RhLR o LasR regulan *rhII*, también construyeron la fusión transcripcional *rhII-lacZ*, la introdujeron en PAO1 y las dos mutantes regulatorias PAOR y PANO67. En ninguna de las mutantes se expresó *rhl-lacZ* y al usar el sistema en *E. coli*, se observó máxima expresión *rhl-lacZ* al suministrar RhIR con BHL y una restauración parcial de la actividad al añadir *lasR*-OdDHL.

También fue de gran importancia en este trabajo la observación de que una fusión *rpos-lacZ* de *P. aeruginosa* en *E. coli*, era expresada sólo al introducir un plásmido con *rhIR* en presencia del autoinductor BHL, sugiriendo una estrecha regulación entre el sistema "quorum sensing" RhIR/BHL y la expresión del gen *rpoS*, el cual codifica σ^S , un factor sigma de fase estacionaria de crecimiento

que ha sido reconocido como un regulador global de respuesta a estrés (16,17).

Previamente Huisman y Kolter (18) habían reportado que la homoserín lactona exógena era capaz de activar la expresión de *rpoS* en *E. coli*. El hecho de que Latifi y cols., (26) encontraran que la expresión de *rpoS* se anulaba en las dos mutantes deficientes en generar moléculas señal de acil-homoserín lactonas, sugieren una conexión entre los sistemas "quorum sensing" y RpoS. En base a estos hallazgos, los autores propusieron un modelo de regulación jerárquico para los dos sistemas "quorum sensing" y el factor sigma *rpoS*, todos ellos operando cuando las células alcanzan alta densidad celular. El modelo propone una jerarquía regulatoria, en la cual el sistema *lasR/lasI* regula la transcripción de *rhIR*. Luego RhIR activa la transcripción de *rhII*, el cual promueve la acumulación de BHL, y el complejo RhIR/BHL activa la transcripción de *rpoS*.

La relación RhIR/BHL con RpoS puede ser muy importante en la virulencia de *P. aeruginosa*. Recientemente se puso en evidencia que el gen *lexA*, codificando lectina citotóxicas PA-IL, posee en su región regulatoria un promotor con secuencia consenso para RpoS (s^S) y una caja tipo "lux". Efectivamente, se demostró que la expresión de *lexA* se anula por completo en mutantes *rpoS* y es estimulada por adición de RhII/BHL (43).

El modelo integral fué apoyado por estudios de expresión de fusiones transcripcionales *lasR-lacZ* y *rhIR-lacZ* en una cepa de *P. aeruginosa* doble mutante *lasI*⁻ y *rhII*⁻ deficientes en generar autoinductores PAI-1 y PAI-2, respectivamente (35). Se encontró que la adición de PAI-1 era capaz de restaurar la expresión de ambas fusiones transcripcionales, mientras que la adición de PAI-2 solo, no tenía ningún efecto, demostrando que la transcripción de *rhIR* es regulada positivamente por LasR/PAI-1.

Propusieron que el sistema LasR/LasI controla la transcripción de *rhIR* y que el sistema *rhl* responde a la densidad celular solo a través del sistema *lasR/lasI*, el cual está directamente sensando el "quorum". Para asegurar que el efecto de PAI-1 sobre *rhIR* es mediado por LasR, estudiaron la expresión de *rhIR-lacZ* en el sistema heterólogo de *E. coli*, en presencia o ausencia de *lasR* y PAI-1. Observaron incrementos de la actividad promotora de *rhIR* solo si estaban presentes LasR y PAI-1. Además sugirieron que la regulación *rhl* por LasR/PAI-1 ocurre también a nivel post-traducciona, ya que PAI-1 bloqueaba la actividad de PAI-2. Esto fue demostrado porque la habilidad de RhIR y PAI-2, para activar

la transcripción de la fusión transcripcional *rhIA-lacZ* (*rhIA* codifica ramnosiltransferasa y es dependiente del sistema RhIR/RhII/ PAI-2) disminuía de una manera dosis-dependiente, a medida que se incrementaba la concentración de PAI-1, indicando que PAI-1 podría bloquear los sitios de unión de PAI-2 en RhIR y explicar la inhibición.

Especularon que el control post-traducciona l de RhIR por PAI-1, ocurre antes que *rhl* sea inducido para producir PAI-2, siendo las concentraciones de PAI-1 mucho mas altas que PAI-2. Entonces PAI-1 podría bloquear la unión de PAI-2 a RhIR, hasta que PAI-2 alcance un nivel suficiente para contrarrestar el bloqueo. Esto podría permitir a *P. aeruginosa* retardar la inducción de genes controlados por el sistema "quorum sensing" RhIR/BHL.

A los datos acumulados hasta ese momento se sumaron otras evidencias a través del mismo enfoque de dobles mutantes. Pearson y cols. (34) construyeron cepas de *P. aeruginosa* mutantes *DlasI*, *DrhII* y dobles mutantes en ambos genes y estudiaron el efecto de la ausencia de estos genes sobre la expresión de elastasa y ramnolípidos, los principales blancos de ambos sistemas "quorum sensing", para dilucidar así, la contribución de cada sistema en la expresión de estos exoproductos. Analizaron actividad elastolítica (por "Elastin Congo red" o ECR) y síntesis de ramnolípidos (por ensayos de orcinol) en fluídos de cultivos de estas cepas mutantes. Observaron que tanto la elastólisis, como la producción de ramnolípidos, disminuían significativamente en ambas mutantes (*DlasI* y *DrhII*).

Cuando cada mutante era complementada con el gen correspondiente, es decir *lasI* o *rhII*, según era el caso, se restituía la capacidad de producir elastasa y ramnolípidos. La adición de PAI-1 a los cultivos de *DlasI* restauraba la elastólisis, pero solo parcialmente la producción de ramnolípidos, mientras que la adición de PAI-2 a cultivos de la mutante *DrhII* restauraba tanto la producción de ramnolípidos como de elastasa. La producción de elastasa y ramnolípidos se anuló por completo en la cepa doble mutante *lasI*, *rhII*. La complementación total de la elastólisis y síntesis de ramnolípidos en esta mutante, ocurría solamente si se agregaban al cultivo los dos autoinductores PAI-1 y PAI-2, o si la cepa se transformaba con un plásmidos que incluyera los dos genes *lasI* y *rhII*.

En este trabajo se mostró que tanto la producción de elastólisis como de

ramnolipidos depende de ambos sistemas "quorum sensing". Sin embargo, la adición de PAI-1 en la mutante *lasI*, restauraba solo parcialmente la producción de ramnolipidos, sugiriendo que posiblemente otros autoinductores, además del autoinductor principal PAI-1, sintetizados por *LasI*, pudieran contribuir en la regulación de la síntesis de ramnolipidos, vía sistema *rhIR/rhII*.

Todos los datos presentados resaltan el papel de los sistemas "quorum sensing" en la regulación de la expresión de exoproductos que intervienen directamente en la virulencia en *P. aeruginosa*, sin embargo datos recientes demuestran que los sistemas "quorum sensing" también pueden regular indirectamente otros productos génicos relacionados con virulencia, como es el caso de genes esenciales para la resistencia a estrés oxidativo. Las mutantes *lasR*/*rhII*⁻ muestran expresión disminuída de genes *sod* y *kataA* que codifican superóxido dismutasas y catalasa respectivamente (15), enzimas que defienden la célula del daño oxidativo causado por radicales superóxido y peróxido de hidrógeno. De hecho, las mutantes resultaron sensibles a intermediarios de oxígeno reactivo, lo cual puede ser indicativo de un rol importante de los sistemas "quorum sensing" en la defensa de *P. aeruginosa* contra ataques oxidativos mediados por células del sistema inmune del hospedador.

El papel de los sistemas "quorum sensing" en la regulación de determinantes de virulencia también se ha explorado directamente en modelos de infección utilizando animales de experimentación. Se ha demostrado que las mutantes *lasR*, *lasI*⁻ y *rhII*⁻ exhiben una disminución en modelos de quemaduras de piel en ratones, siendo el fenotipo de virulencia atenuada, más drástico en dobles mutantes *lasI*⁻, *RhII*⁻ (38). Cuando los genes correspondientes se introducen sobre plásmidos multicopia en las cepas mutantes, se restaura su habilidad para multiplicarse en este tipo de lesiones.

También se ha reportado la importancia de los genes "quorum sensing" en modelos de infección pulmonar en roedores. Las ratas infectadas con cepas de *P. aeruginosa* doble mutante *lasI*⁻, *rhII*⁻ exhiben patología en tejido pulmonar menos severa que aquellas infectadas con cepa silvestre después de 14 a 28 días post-infección (46). Adicionalmente, utilizando un sistema reportero en *E. coli*, se detectaron moléculas de homoserín lactonas "in vivo" en tejido pulmonar con patologías severas en ratones infectados con *P. aeruginosa* (47).

Modelo de regulación por sistemas quorum sensing en *P. aeruginosa*

En la figura 6 se presenta un modelo que integra lo que se conoce hasta ahora sobre la regulación jerárquica de los dos sistemas "quorum sensing" en *P. aeruginosa*. El circuito comienza con la transcripción de *lasR*, inducida por un posible activador transcripcional aún no identificado, o tal vez por un mecanismo de derrepresión de algún regulador negativo. LasR activa la transcripción de *lasI*, el cual promueve la acumulación del autoinductor PAI-1 a alta densidad celular. PAI-1 se une a LasR, este complejo amplifica la respuesta activando la transcripción de *lasR* y *lasI* (autorregulación positiva) a la vez que dirige la transcripción de otros genes del regulón Las, entre ellos: *lasB*, *lasA*, *toxA*, *apr*, *rhIR* y *rhII*. Una vez expresado RhIR, éste forma un complejo con la segunda molécula autoinductora PAI-2, sintetizado por RhII. Este complejo dirige la síntesis de *rhII*, acumulándose PAI-2 en la célula y se hace disponible para la formación de mas complejos activadores RhIR-PAI-2 que estimulan la transcripción de *rhIAB*, *lasB*, *rpoS* y *rhII*. Se indica con línea discontinua la regulación post-traducciona propuesta de PAI-1 sobre RhIR. Se ha sugerido que PAI-1 inicialmente, alcanza mayor concentración que PAI-2 y se asocia con RhIR rindiendo la formación de complejos activadores RhIR-PAI-2. Los complejos RhIR-PAI-1 parecen ser inactivos. A esta red regulatoria podría integrarse un tercer gen homólogo a *lasR*, encontrado en el genoma de *P. aeruginosa*, designado *qscR* ("quorum sensing control"). Este gen parece regular el tiempo en el cual la expresión de genes es controlada por "quorum sensing", ejerciendo su efecto presumiblemente por represión de *lasI*. Una mutante *qscR*, produce señales generadas por LasI prematuramente, lo cual resulta en transcripción inoportuna de genes regulados por "quorum sensing" (5). La represión de *lasI* por QscR podría garantizar que los genes controlados por "quorum sensing" no sean activados en ambientes o condiciones de vida celular donde los mismos no son requeridos. Con "otros" se sugieren genes adicionales, no identificados hasta el momento, que pueden pertenecer a estos regulones. Se indica regulación positiva con signo + y regulación negativa se representa con -.

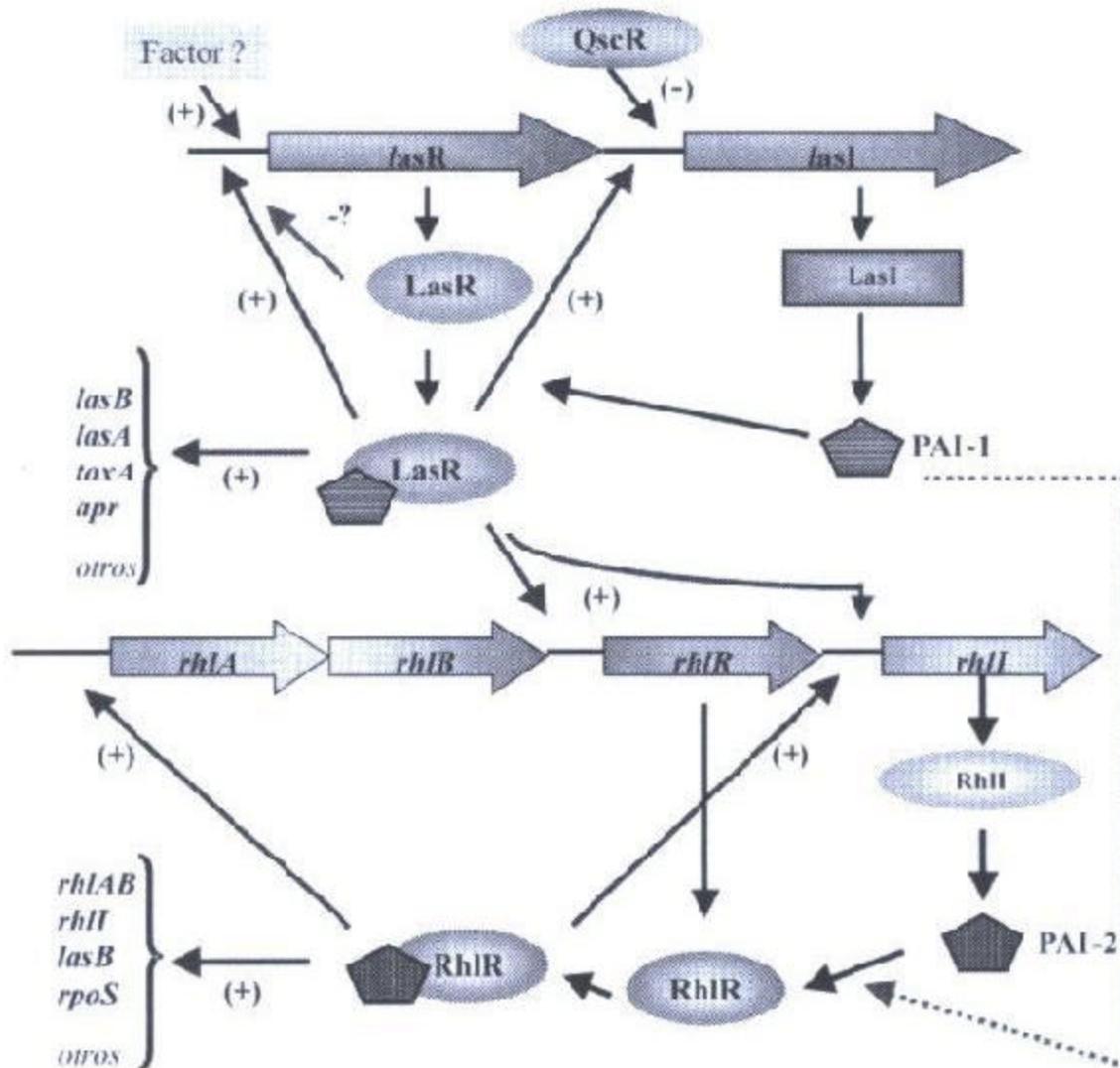


Figura 6. Modelo del circuito regulatorio de los dos sistemas "Quorum sensing" descritos en *Pseudomonas aeruginosa*. Se incorporan los datos acumulados hasta el presente. Ver descripción en el texto.

Conclusión

Aunque la multicelularidad se consideraba una estrategia adaptativa especializada limitada a grupos particulares de bacterias, como Myxobacterias, en los últimos 10 años, se ha aceptado la noción de comunicación intercelular y comportamiento multicelular en la mayoría de géneros bacterianos, tanto en Gram-negativos como Gram-positivos, permitiéndoles una estrecha coordinación

en el crecimiento y actividades bioquímicas, que se traducen en beneficios adaptativos.

Una gran variedad de genes blanco controlados por autoinducción o sistemas "quorum sensing", descritos en bacterias Gram-negativas, codifican factores de virulencia, afectando animales y plantas. En el caso particular de *P. aeruginosa*, al menos dos sistemas "quorum sensing" regulan varios factores de virulencia y esto podría explicar en parte el éxito de este patógeno. Por ejemplo en los abscesos alveolares desarrollados durante neumonía, *P. aeruginosa* crece a altas densidades celulares y es posible que los sistemas de autoinducción causen un incremento en la síntesis de productos tóxicos y degradativos.

Por otra parte, el hallazgo de una asociación entre el sistema "quorum sensing" RhlR/RhlI y el factor sigma de fase estacionaria RpoS, el cual a su vez se reconoce como un regulador global de respuesta a estrés, sugiere que este circuito regulatorio puede resultar en la expresión de genes que permiten a la bacteria resistir a diversas condiciones de estrés encontradas en tejidos del hospedador, amplificando el potencial virulento de este patógeno oportunista de importancia clínica.

La caracterización genética, bioquímica y fisiológica de estos sistemas "quorum sensing" contribuyen en general, a la comprensión de mecanismos de regulación de la expresión de genes en procariontes y a dilucidar mecanismos de virulencia en organismos patógenos. En el caso particular de *P. aeruginosa*, este tipo de regulación adquiere cada vez más atención y se encuentra bajo investigación activa, dada su importancia en la regulación de la expresión de genes de virulencia en este patógeno oportunista.

Referencias Bibliográficas

1. Bainton, N. J., Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Stead, P., Gledhill, L., Hill, P. J., Rees, C. E. D., Winson, M. K., Salmond, G. P. C., Stewart, G. S. A. B. and Williams, P. A general role for the *lux* autoinducer in bacterial cell signalling: control of antibiotic biosynthesis in *Erwinia*. *Gene*, 1992; 116: 87-91.
2. Beck Von Bodman, S. and Farrand, S. K. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an N-acylhomoserine lactone autoinducer. *J. Bacteriol.*, 1995; 177: 5000-5008.
3. Blackwood, L.L., Stone, R. M., Iglewski, B. H., and Pennington, J. E.

Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and elastase as virulence factors in acute lung infection. *Infect. Immun.*, 1983; 39: 198-201.

4. Brint, J. M. and Ohman, D. E. Synthesis of multiple exoproducts in *Pseudomonas aeruginosa* is under the control of RhIR-RhII, another set of regulators in strain PAO1 with homology to the autoinducer-responsive LuxR-LuxI family. *J. Bacteriol.*, 1995; 177: 7155-7163.

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

6. Devine, J. H., Shadel, G. S., and Baldwin, T. O. Identification of the operator of the *lux* regulon from the *Vibrio fischeri* strain ATCC7744. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86: 5688-5692.

7. Eberhard, A., Longin, T., Widrig, C. A., and Stranick, S. J. Synthesis of the *lux* gene autoinducer in *V. fischeri* is positively autoregulated. *Arch. Microbiol.* 1991; 155: 294-297.

8. Fuqua, C., Burbea, M., and Winans, S. C. Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the *traM* gene. *J. Bacteriol.*, 1995; 177: 1367-1373.

9. Fuqua, C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 1996; 50: 727-751.

10. Fuqua, W. C. and Winans, S. C. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.*, 1994; 176: 2796-2806.

11. Fuqua, W. C., Winans, S. C., and Greenberg, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.*, 1994; 176: 269-275.

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

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

14. Govan, J. R. and Deretic, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.*, 1996; 60: 539-574.
15. Hassett, D. J., Ma, J. F. Elkins, J. G., Mcdermott T.r. Ochsner, U. A., West, S. E., Huang, C. T., Fredericks, J., Burnett, S., Stewart, P. S., Mcfeters, G., Passador, L. and Iglewski, B. H. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalasa and superoxide dismutase genes and mediates biofilms susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol. Microbiol.*, 1999; 34: 1082-1093.
16. Hengge Aronis, R. Back to log phase: σ^S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 1996; 21: 887-893.
17. Hengge Aronis, R. Interplay of global regulators in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 1999; 2: 148- 152.
18. Huisman, G. W., and Kolter, K. Sensing starvation: a homoserine lactone dependent signalling pathway in *Escherichia coli*. *Science*. 1994; 265: 537-539.
19. Hwang, I., Cook, D. M., Farrand, S. K. A new regulatory element modulates homoserine lactone-mediated autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer. *J. Bacteriol.*, 1995; 177: 449-458.
20. Hwang, I., Li, P. L., Zhang, L., Piper, K. R., Cook, D. M., Tate, M. E. and Farrand, S. K. TraI, a LuxI homologue, is responsible for production of conjugation factor, the Ti plasmid N-acylhomoserine lactone autoinducer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 4639-4643.
21. Jones, S., Yu, B., Bainton, N. J., Birdsall, M. Bycroft, B. W., Chhabra, S. R., Cox, A. J. R., Golby, P., Reeves, P. J., Stephens, S., Winson, M. K., Salmond, G. P.C., Stewart, G.S.A.B., and Williams, P. The *lux* autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*, *EMBO J.*, 1993; 12: 2477-2482.
22. Kaiser, D. and Losick, R. How and why bacteria talk to each other. *Cell*, 1993; 73: 873-885.
23. Kaplan, H. B., and Greenberg, E. P. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.*, 163, 1210-1214.
24. Koch, A. K., Kappeli, O., Fiechter, A. and Reiser, J. 1991. Hydrocarbon

assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. J. Bacteriol., 1985; 173: 4212-4219.

25. Latifi, A. Winson, M. K., Foglino, M., Bycroft, B. W., Stewart, G. S. A. B., Lazdunski, A. and Williams P. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Mol. Microbiol., 1995; 17: 333-343.

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

27. Mcclean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, S. A. B., and Williams, P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiology, 1997; 143: 3703-3711.

28. Meighen, E. A. Molecular biology of bacterial bioluminescence. Microbiol. Rev., 1991; 55: 123-142.

29. Ochsner, U. A., and Reiser, J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. 1995. Biochem, 1995; 92: 6424-6428.

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

31. Parsek, M. Greenberg, E. P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 2000; 97: 8789-8793.

32. Passador, L., Cook, J. M., Gambello, M. J., Rust, L., and Iglewski, B. H. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes require cell-to-cell communication. Science, 1993; 260: 1127-1130.

33. Pearson, J. P., Passador, L., Iglewski, B. H. and Greenberg, E. P. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995; 92: 1490-1494..

34. Pearson, J. P., Pesci, E. C. and Iglewski, B. H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa las* and *rhl* Quorum-sensing systems in control of elastase and

rhamnolipid biosynthesis genes. J. Bacteriol., 1997; 179: 5756-5767.

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

36. Piper, K. R., Beck Von Bodman, S., and Farrand, S. K. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. Nature, 1993; 362: 448-450.

37. Reynolds, H. Y., Levine, A. S., Wood, R. E., Zierdt, C. H., Dale, D. C. and Pennington, J. E. *Pseudomonas aeruginosa* infections: persisting problems and current research to find new therapy. Ann. Intern. Med., 1975; 82: 819-831.

38. Rumbaugh, K. P., Griswold, J. A. Iglewski, B. H. and Hamood, A. N. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. Infect Immun, 1999; 67: 5854-5862.

39. Throup, J., Camara, M., Briggs, G., Winson, M. K., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Williams, P., and Stewart, G. S. A. B. Characterization of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. Mol. Microbiol., 1995; 17: 345-356.

40. Toder, D. S., Gambello, M. J., and Iglewski, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase gene under transcriptional control of *lasR*. Mol. Microbiol., 1991; 5: 2003-2010.

41. Winson, M. K., Camara, M., Latifi, A., Foglino, M., Chhabra, S. R., Daykin, M., Bally, M., Chapon, V., Salmond, G. P. C., Bycroft, B. W., Lazdunski, A., Stewart, G. S. A. B. and Williams, P. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecule regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92: 9427-9431.

42. Winson, M. K., Swift, S. Fish, L., Throup J. P., Jorgensen, F., Chhabra, S. R., Bycroft, B. W., Williams, P. and Stewart, G. S. A. B. Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. FEMS Microbiol. Lett., 1998; 163: 185-192.

43. Winzer, K., Falconer, C., Garber, N., Diggle, S., Camara, M. and Williams, P. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL y PA-IIL are controlled by quorum sensing and RpoS. J. Bacteriol., 2000; 182: 6401-6411.

44. Withers., H., Swift, S. and Williams, P. Quorum sensing as an integral

kasmera-completa

component of gene regulatory networks in gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2001; 4: 186-193.

45. Wood, D. W., and Pierson, L. S. I. The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for the production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production. *Gene*, 1996; 168: 49-53.

46. Wu, H., Givskov, M., Doring, G., Worlitzsch, D., Mathee, K. Rygaard, J. and Hoiby, N. *Pseudomonas aeruginosa* mutations in *lasI* and *rhlI* quorum sensing system result in milder chronic lung infection. *Microbiol.*, 2001; 147: 1105-1113.

47. Wu, H., Song, Z., Hentzer, M., Andersen, J.B., Heydorn, A., Mathee, K., Moser, C., EBERI, L., Molin, S., Hoiby, N and Givskov, M. Detection of N-acylhomoserine lactones in lung tissues of mice infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.*, 2000; 146: 2481-2493.