

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN**



**UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS**



**Estudio de la respuesta de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000
a flavonoides**

TESIS DOCTORAL

Paola Andrea Vargas Gallego

2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Paola Andrea Vargas Gallego
D.L.: GR 192-2014
ISBN: 978-84-9028-712-5

**Estudio de la respuesta de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000
a flavonoides**

Memoria que presenta la licenciada en Biología,
Paola Andrea Vargas Gallego, para optar al título de Doctor

Fdo. Paola Andrea Vargas Gallego

VºBº

De la Directora de Tesis

Fdo. María Trinidad Gallegos Fernández

Doctora en Biología

Investigadora Científica del CSIC

Universidad de Granada

2013

María Trinidad Gallegos Fernández, Investigadora Científica de OPIS en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

Informa:

Que el trabajo de investigación titulado “Estudio de la respuesta de *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 a flavonoides”, realizado por la licenciada Paola Andrea Vargas Gallego bajo mi dirección, se considera ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en la Universidad de Granada.

Granada, Mayo de 2013.

Fdo.: Dra. María Trinidad Gallegos Fernández.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Grupo Interacciones Planta-Bacteria perteneciente al Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín, gracias a una beca del Programa “Junta para la Ampliación de Estudios” JAE Predoc del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) cofinanciada por FEDER y a una beca Marie Curie Training Site for Marine Microbiology (MARMIC EST), financiada por la Comunidad Europea. La investigación ha sido financiada con los proyectos BFU2007-60272 y BFU2008-00086, del Ministerio de Ciencia e Innovación de España, BIO2011-23032 del Ministerio de Economía y competitividad, y P08-CVI-3745, de la Junta de Andalucía; todos cofinanciados por FEDER.

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en los siguientes congresos y publicaciones:

Publicaciones

Vargas, P., Felipe, A., Michán, C., y Gallegos, M.T. 2011. Induction of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 MexAB-OprM Multidrug Efflux Pump by flavonoids is mediated by the repressor PmeR. *Mol Plant Microbe Interact.* 24: 1207-1219.

Vargas, P., Farias, G.A., Carvajal, V., Barón, M., Rivilla, R., Martín, M., Olmedilla, A., y Gallegos, M.T. 2013. Plant flavonoids target *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 flagella and type III secretion system. Presentado en *Environmental Microbiology Reports*.

Congresos

Vargas, P.; Gallegos, M.T. 2012. PmeR, un regulador transcripcional que controla la resistencia a flavonoides en *P. syringae* pv. tomato DC3000. *XVI Congreso Nacional Sociedad Española de Fitopatología*. Málaga, España.

Araujo, G.; Vargas, P.; Rivilla, R.; Olmedilla, A.; Gallegos, M.T. 2012. Efecto de los flavonoides sobre *P. syringae* pv. tomato DC3000. *XVI Congreso Nacional Sociedad Española de Fitopatología Málaga*, España.

Vargas, P.; Forte, I.; Felipe, A.; Gallegos, M.T. 2010. *P. syringae* MexAB-OprM efflux pump, an effective protection against plant secondary metabolites. *8th International Conference on Pseudomonas syringae and related pathogens*. Oxford, Reino Unido.

Vargas, P.; Felipe, A.; Gallegos, M.T. 2009. *P. syringae* efflux pumps, fighting on multiple fronts. *Pseudomonas 2009, XII International Conference*. Hannover, Alemania.

Vargas, P.; Felipe, A.; Gallegos, M.T. 2009. Resistencia a compuestos antimicrobianos vegetales en bacterias patógenas de plantas. *III Reunión del Grupo especializado SEM “Microbiología de Plantas”*. MIP09. Granada, España.

La doctoranda D^a Paola Andrea Vargas Gallego y la directora de la tesis D^a María Trinidad Gallegos Fernández, garantizamos al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de la directora de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, Mayo de 2013.

María Trinidad Gallegos Fernández
Directora de Tesis

Paola Andrea Vargas Gallego
Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

*"Everything should be made simple as possible,
but not simpler"*
Albert Einstein.

A mamá y papá
A Lina y a Juan Jo
A Chema

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas aquellas personas que a lo largo de estos años han aportado su granito de arena a esta tesis, haciendo de esta una experiencia enriquecedora no sólo a nivel científico sino también a nivel personal.

A mi directora de tesis la Dra. Mari Trini Gallegos, por haberme recibido en su grupo de trabajo, por su dirección científica y dedicación a esta tesis durante estos cinco años, y por enseñarme a ver las cosas desde otro punto de vista.

Al Dr. Juan Sanjuán, a la Dra. María José Soto y al Dr. José Olivares, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo, por su interés, sus discusiones científicas y provechosos consejos.

Al Dr. Rafael Rivilla y Dra. Marta Martín por abrir un espacio en su laboratorio para realizar mi estancia, contribuyendo en parte en nuestra curiosidad por el complejo mundo de la motilidad bacteriana.

A la Dra. Carmen Michán por su ayuda, paciencia e introducción a la qRT-PCR, y a la Dra. Silvia Marqués por resolver mis dudas y por sus consejos con la primer extensión.

A mi familia Colombiana en Granada: Allito gracias por compartir esta aventura conmigo y por iniciarme en este mundo, más que un amigo eres como un hermano. A mi querida Sofy y la creatividad que brotan de ella, gracias por tus palabras de ánimo y disposición para ayudar. Espero que algún día estemos todos juntos en el *Dorado*.

A Carito, Harold, Vivi, David, Isa, Carol y Mafe, por su amistad, porque para mí son más que compañeros de laboratorio o de universidad, las risas, el llanto y sobre todo, los buenos momentos compartidos, han dado un toque especial a estos últimos años.

A mi querido Lab 280 y sus anexos: Patri D, Sophie, Tesi, Dani, Javi, gracias por recibirme con los brazos abiertos, por su calidez y ayuda desde el primer momento, nunca olvidaré ese primer invierno en Granada. En especial a Patri Marín por su amistad y por preocuparse con ese amor de mamá.

A mis compis de grupo: Lydia, Lorena, Dani, Virgi y Nieves, por compartir más que un café durante el desayuno y hacer más amena la mañana. A Toñi, por su ayuda con los experimentos y por enseñarme a trabajar correctamente en el labo de radioactividad. A Adela y a Gabriela, por su colaboración con los ensayos de microscopía. A Quina, M^a José Lorite y Soco por su amabilidad y disposición para responder mil veces a la misma pregunta.

A mis amigos de Granada que se han ganado un lugar en mi corazón: A Amalia y Miguel, por ser tan especiales, por preocuparse por mí y por buscar siempre la palabra adecuada para levantarme el ánimo, gracias por esas tardes de tapas, de charlas y de risas. A Águeda, por que sin su compañía

esta tesis hubiese tenido un color diferente, por su alegría y por ayudarme a ver que siempre hay algo más en la vida, eres mi granaina favorita. A mi querida Euge, como tú lo dijiste: ese agosto hubiera sido diferente sin vos, gracias por ser tan crítica y por enseñarme a valorar mi trabajo.

A todos aquellos que con su compañía han hecho más agradable mi estancia en la EEZ: Andreas, María, Saray, Sandy, Alí, Paty, Marta, Vane, Craig, Marichu, Antonio Jesús, Carmen, Irene, PatriB y a tod@s aquellos que siempre me ofrecieron una sonrisa para continuar.

A mis amigas de estancia Ingruchis, Eva y Shalin, por hacer de Bremen un lugar especial. A Fran, Ana y Emma, por compartir conmigo algunos secretos de Madrid. A todos los molotovianos por hacer este último año más agradable.

A todo el personal de la EEZ administrativo, técnico, de limpieza, de seguridad y de informática, en especial a Pedro por su cálido recibimiento en la mañana y a César por ayudarme siempre con mi PC.

A toda mi familia, su amor y apoyo ha sido fundamental para seguir adelante. Mamita gracias por cuidar siempre de mí, por no dejarme desfallecer y ser el ejemplo más grande de amor que tengo. Papito gracias por confiar en mí, por sentirte orgulloso de tu niña y de celebrar como tuyos mis logros. A LinaFer porque eres una gran hermana, por tu sinceridad y cariño, sobre todo por la vida que tu y Chalo nos han regalado; a mi bichito JuanJo por permitirme ser tu tía virtual, de corazón estoy siempre contigo. A mis abuelitos, por su amor y por tenerme siempre presente en sus oraciones. A mi abuelita Rosalba, la huella que has dejado en nosotros es imborrable, ejemplo de valor y tenacidad. A mis primos: Melu, Juli, Hansel y los mas peques; a mis tías y mi tío, gracias por apoyarme en la distancia. A Dios por darme fuerza en cada momento. A mi familia política por su confianza en mí y permitirme ser parte de su linda familia.

Gracias Chema por tu amor, paciencia, ternura y apoyo incondicional, en especial por creer en mí, dar tranquilidad a mi vida y mostrarme el lado sencillo de las cosas. Gracias por compartir tu vida y este sueño conmigo.

RESUMEN

Las plantas responden activamente al estrés causado por heridas provocadas por daño mecánico o por el ataque de insectos o microorganismos, produciendo fitoalexinas y otros metabolitos que pueden inducir la producción de compuestos protectores, ya sea en el sitio de la lesión o sistémicamente en tejidos no afectados. Los flavonoides son algunos de los metabolitos secundarios de plantas más abundantes que pueden disuadir a los microorganismos o actuar como agentes anti-infección, ya que suprimen la virulencia bacteriana y tienen actividad antimicrobiana. Sin embargo, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia frente a estos compuestos. Uno de los más eficientes es la eliminación activa de compuestos tóxicos con estructuras químicas diferentes mediante unos transportadores de membrana denominados también bombas.

El presente trabajo de tesis se ha centrado en el estudio de *P. syringae* pv. tomato DC3000, bacteria causante de la mancha negra del tomate y patógena de la planta modelo *A. thaliana*. Pto DC3000 es utilizada como modelo para el estudio de la interacción patógeno-hospedador y la secuenciación de su genoma ha permitido el estudio de distintas funciones de interés. DC3000 posee un amplio repertorio de sistemas de transporte, de los cuales 12 están anotados como transportadores pertenecientes a la familia RND (*Resistance*, *Nodulation*, *Cell division*). Aunque se ha demostrado la existencia y el papel de transportadores RND en algunas bacterias fitopatógenas, la función de los mismos y sobre todo su regulación, estaba menos estudiada en *P. syringae* al inicio de este trabajo de tesis. Por tanto, el objetivo principal de esta tesis ha sido el estudio de la respuesta de Pto DC3000 a flavonoides producidos por las plantas con el propósito de determinar el papel del sistema PmeR/MexAB-OprM en la resistencia de esta bacteria a los mismos, estudiando la regulación génica del sistema PmeR/MexAB-OprM y caracterizando bioquímica y funcionalmente la proteína reguladora PmeR. Además, se ha investigado el efecto de los flavonoides sobre la motilidad y el sistema de secreción tipo III de Pto DC3000.

En primer lugar, se estudió el papel de la bomba de eflujo MexAB-OprM como mecanismo de defensa de Pto DC3000 frente a flavonoides, demostrando que está implicada en la resistencia intrínseca de DC3000 a un amplio rango de compuestos. Hemos estudiado la expresión del operón *mexAB-oprM* y del gen regulador, *pmeR*, así como el papel de la proteína PmeR en la transcripción de ambos operones. *mexAB-oprM* y *pmeR* se expresan *in vivo* a un nivel basal elevado y moderado, respectivamente, y la presencia de diferentes flavonoides y otros compuestos antimicrobianos provoca un aumento de la expresión de ambos. Los resultados demuestran que PmeR es el represor local del promotor de *mexAB-oprM* y que también regula su propia expresión uniéndose a un operador pseudopalindrómico que solapa con ambos promotores. PmeR modula la expresión de *mexAB-oprM* y

pmeR al unirse a flavonoides, lo que provoca un cambio conformacional en la proteína que interfiere con su unión al ADN. Por último y mediante experimentos *in planta*, hemos demostrado que el sistema PmeR/MexAB-OprM contribuye a la supervivencia y a la colonización de las plantas de tomate.

En segundo lugar, se estudió la acción de los flavonoides sobre algunos factores de virulencia de Pto DC3000 que son claves en la interacción planta-patógeno. En Pto DC3000 los flavonoides disminuyen la motilidad tipo *swimming* y tipo *swarming* y causan la pérdida de flagelos porque inhiben la expresión de FliC. Además, la expresión y el ensamblaje de un sistema de secreción tipo III funcional se reduce en presencia de floretina porque provoca un descenso en los niveles de ARNm de *hrpL*. En *P. syringae* la ruta de señalización Gac-Rsm controla diferentes procesos bacterianos. En presencia de floretina, los niveles del ARN regulador *rsmY* disminuyen claramente en la cepa silvestre, pero no en un mutante en *gacA*. Todos estos resultados sugieren que la floretina inhibe la función del sistema de transducción de señal GacS/GacA, causando una disminución del ARN *rsmY*, lo que afecta a la síntesis de dos factores de virulencia importantes de Pto DC3000, los flagelos y el sistema de secreción tipo III.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que Pto DC3000 posee un mecanismo a prueba de fallos para superar las defensas del hospedador, ya que detecta y responde a los flavonoides por, al menos, una vía de señalización (Gac-rsm) y dos cascadas de expresión génica (flagelos y T3SS), induciendo al mismo tiempo la expresión del sistema MexAB-OprM. Por tanto, los flavonoides actúan como moléculas señal en la interacción planta-patógeno.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	xxv
ÍNDICE DE TABLAS	xxix
ABREVIATURAS	xxxix
INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Pseudomonas syringae</i>	3
2. Características de <i>P. syringae</i> que facilitan su adaptación a la filosfera	4
3. Factores de virulencia de <i>P. syringae</i>	6
3.1. El sistema de secreción tipo III	6
3.1.1. Regulación de la expresión del T3SS en <i>P. syringae</i>	9
3.2. Producción de toxinas	11
3.3. Motilidad	12
3.3.1. Estructura del flagelo	12
3.3.2. Regulación y ensamblaje del aparato flagelar	14
3.4. Regulación global. El sistema de dos componentes GacS/GacA	18
4. Resistencia a compuestos antimicrobianos mediada por transportadores	21
4.1. Transportadores RND	23
4.2. Regulación de la expresión de transportadores MDR bacterianos	24
4.3. Transportadores RND en bacterias fitopatógenas	25
5. <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	26
6. Flavonoides	31
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Cepas bacterianas	41
2. Plásmidos	42
2.1. Plásmidos utilizados en este trabajo	42
2.2. Plásmidos construidos en este trabajo	42
2.3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	45
3. Medios y condiciones de cultivo	46
3.1. Medios	46
3.1.1. Medios ricos	46
3.1.2. Medios mínimos	46
3.2. Antibióticos	47
3.3. Flavonoides	48
3.4. Condiciones de cultivo	48

3.5. Conservación de los cultivos bacterianos.....	48
3.6. Transformación bacteriana.....	49
3.6.1. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	49
3.6.2. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	49
3.6.3. Preparación de células electrocompetentes.....	50
3.6.4. Electrotransformación.....	50
3.6.5. Selección de intercambio alélico y cointegración.....	50
4. Ensayos <i>in vivo</i>	51
4.1. Curvas de crecimiento.....	51
4.2. Ensayos de sensibilidad a compuestos antimicrobianos.....	51
4.2.1. Ensayos de MIC.....	51
4.2.2. Ensayos de difusión en placa.....	52
4.3. Ensayos de competencia en medio líquido.....	52
4.4. Ensayos de motilidad bacteriana.....	53
4.4.1. Ensayos de <i>swimming</i>	53
4.4.2. Ensayos de <i>swarming</i>	53
4.5. Ensayo enzimático de la actividad β -galactosidasa.....	53
4.6. Ensayos de plantas.....	54
4.6.1. Preparación del inóculo.....	54
4.6.2. Ensayos de infección individual.....	55
4.6.3. Ensayos de competencia.....	55
4.7. Ensayos de auto-aglutinación.....	55
5. Técnicas de manipulación de ADN.....	56
5.1. Aislamiento de ADN.....	56
5.1.1. Aislamiento de ADN total.....	56
5.1.2. Extracción de ADN plasmídico.....	56
5.2. Determinación de la concentración de ADN.....	56
5.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	57
5.4. Reacción de defosforilación de ADN con fosfatasa alcalina.....	57
5.5. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR).....	57
5.5.1. PCR de colonia.....	58
5.6. Clonaje de fragmentos.....	58
5.6.1. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	58
5.6.2. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación.....	58
5.6.3. Secuenciación y análisis de secuencias.....	59
5.7. Electroforesis de ADN.....	59
5.7.1. Electroforesis en geles de agarosa.....	59
5.7.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.....	60

5.7.3. Marcadores de peso molecular	61
5.8. Hibridación ADN-ADN (<i>Southern Blot</i>)	61
5.8.1. Transferencia alcalina por capilaridad	61
5.8.2. Marcaje de la sonda	62
5.8.3. Hibridación y lavados	63
5.8.4. Detección inmunológica.....	63
6. Técnicas de manipulación de ARN	64
6.1. Aislamiento de ARN	64
6.2. Tratamiento con DNasa I.....	65
6.3. Determinación de la integridad y concentración del ARN total	65
6.4. Extensión reversa a partir de un cebador (<i>primer extension</i>)	65
6.4.1. Marcaje de cebadores	66
6.4.2. Hibridación y extensión reversa a partir de cebador.....	66
6.5. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR).....	67
6.6. Cuantificación de la expresión génica por medio de amplificación en cadena a tiempo real (qRT-PCR).....	68
6.6.1. Diseño de los oligonucleótidos	68
6.6.2. Síntesis de ADNc a partir de ARN.....	68
6.6.3. Reacción de amplificación para la cuantificación de la expresión génica relativa (qRT-PCR)	68
6.6.4. Determinación de la eficiencia de los cebadores.....	69
6.6.5. Determinación de productos inespecíficos y estructuras secundarias mediante el análisis de la curva de fusión o curva de melting	70
6.6.6. Cálculo de la expresión relativa.....	70
6.6.7. Cebadores utilizados para PCR cuantitativa	70
7. Purificación y análisis de proteínas	71
7.1. Obtención de proteína total	71
7.2. Sobreexpresión de proteínas	72
7.3. Cromatografía de proteínas.....	73
7.3.1. Cromatografía de afinidad en columna de heparina.....	73
7.3.2. Cromatografía de exclusión molecular preparativa.....	73
7.3.3. Cromatografía de exclusión molecular analítica	74
7.4. Electroforesis de proteínas.....	74
7.4.1. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes	74
7.4.2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (<i>SDS-PAGE</i>).....	74

7.5. Tinción de proteínas con azul de Coomassie	75
7.6. Determinación de la concentración de proteínas.....	75
7.7. <i>Western Blot</i>	75
7.8. Ensayos de retardo en gel.....	76
7.9. Ensayos de impronta <i>in vitro</i> (<i>footprint</i>).....	77
7.9.1. Footprint de protección contra DNasa I	78
7.9.2. Footprint de protección contra metilación por dimetilsulfato (DMS).....	78
8. Ensayos de microscopía	78
8.1. Microscopía electrónica de transmisión.....	78
8.2. Microscopía óptica.....	79
RESULTADOS	81
CAPÍTULO 1:	
CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA PmeR/MexAB-OprM de Pto DC3000.....	83
1. Caracterización <i>in vivo</i> del sistema PmeR/MexAB-OprM de Pto DC3000	85
1.1. Generación de mutantes carentes de la bomba y el regulador	85
1.2. Determinación del perfil de sustratos de la bomba MexAB-OprM	86
1.3. Estudio de la expresión del sistema PmeR/MexAB-OprM en Pto DC3000	91
1.3.1. Análisis de la organización transcripcional de los genes <i>mexAB-oprM</i>	91
1.3.2. Localización de los puntos de inicio de la transcripción e identificación de los promotores de <i>pmeR</i> y <i>mexAB-oprM</i>	92
1.3.3. Identificación de compuestos inductores de la expresión del operón <i>mexAB-oprM</i> y del gen <i>pmeR</i>	94
1.3.4. Determinación del papel de PmeR en la expresión del sistema PmeR/MexAB-OprM.....	96
2. Caracterización bioquímica y funcional del regulador PmeR de Pto DC3000.....	99
2.1. Purificación de la proteína PmeR	99
2.1.1. Clonación y sobreexpresión de la proteína PmeR.....	99
2.1.2. Purificación de la proteína PmeR nativa.....	100
2.2. Estado de oligomerización de PmeR.....	101
2.3. Caracterización funcional de la unión de PmeR al ADN.....	102
2.3.1. Unión específica de PmeR a la región intergénica <i>pmeR-mexA</i>	102
2.3.2. Determinación del operador de PmeR en la región intergénica <i>pmeR-mexA</i>	103
2.4. Caracterización funcional de la unión de PmeR a sus efectores.....	105
2.5. Regulación de <i>pmeR</i>	107
2.5.1. Implicaciones de la secuencia IR en la expresión del promotor de <i>pmeR</i>	110
3. Papel biológico del sistema PmeR/MexAB-OprM	111

3.1. Ensayos de infección en plantas de tomate	111
3.2. Ensayos de competencia <i>in vivo</i>	113
3.2.1. Ensayos de competencia en medio de laboratorio	113
3.2.2. Ensayos de competencia en plantas de tomate	114
CAPÍTULO 2:	
EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES EN FENOTIPOS RELEVANTES	
PARA LA BIOLOGÍA DE Pto DC3000	117
1. Efecto de los flavonoides sobre la motilidad de Pto DC3000	119
1.1. Motilidad tipo <i>swimming</i>	119
1.1.1. Ensayos de motilidad tipo <i>swimming</i> en medio rico LB	120
1.1.2. Ensayos de motilidad tipo <i>swimming</i> en medio mínimo MMF	122
1.2. Motilidad tipo <i>swarming</i>	123
1.3. Implicación del flagelo en la reducción de la motilidad de Pto DC3000 en presencia de flavonoides	125
1.4. Relación entre motilidad y resistencia mediada por MexAB-OprM en Pto DC3000	126
1.5. Efecto de los flavonoides sobre la abundancia de flagelos	128
1.6. Efecto de los flavonoides sobre la expresión de <i>fliC</i>	130
1.7. Efecto de los flavonoides sobre los niveles de flagelina	132
1.8. Efecto de los flavonoides sobre la expresión de genes flagelares	133
1.9. Efecto de los flavonoides sobre los niveles de FliA	136
1.10. Efecto de los flavonoides sobre la cascada reguladora de los flagelos	138
2. Efecto de los flavonoides sobre el sistema de secreción tipo III	142
3. Los flavonoides afectan a la expresión del flagelo y del T3SS a través de la ruta de regulación Gac-Rsm	144
DISCUSIÓN	147
1. Caracterización del sistema PmeR/MexAB-OprM de Pto DC3000	149
2. Efecto de los flavonoides sobre factores de virulencia de Pto DC3000	156
CONCLUSIONES	163
BIBLIOGRAFÍA	167
APÉNDICE	191
Apéndice 1. Concentración de los compuestos utilizados en este trabajo	193
Apéndice 2. Publicación	194

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de <i>P. syringae</i> que mejoran su adaptación a la filosfera.....	5
Figura 2. Sistema de secreción tipo III y <i>pilus</i> Hrp	7
Figura 3. Organización génica de la isla de patogenicidad Hrp de <i>P. syringae</i>	8
Figura 4. Modelo de regulación de los genes <i>hrp/hrc</i> en <i>P. syringae</i>	11
Figura 5. Esquema de los principales componentes del flagelo	13
Figura 6. Modelo propuesto de expresión de los genes flagelares y ensamblaje del flagelo en <i>P. aeruginosa</i>	16
Figura 7. Modelo de la ruta de transducción de señal Gac/Rsm en <i>P. fluorescens</i> CHA0	21
Figura 8. Representación esquemática de los cinco tipos de transportadores MDR caracterizados en bacterias	22
Figura 9. Modelo de organización estructural de los componentes de un transportador tripartito de la familia RND.....	23
Figura 10. Sintomatología causada por <i>P. syringae</i> pv. tomato DC3000 en hojas de tomate	27
Figura 11. Organización de los genes del transportador RND MexAB-OprM y su posible regulador en tres patovares de <i>P. syringae</i>	30
Figura 12. Modelos estructurales de flavonoides.....	31
Figura 13. Hibridaciones ADN-ADN correspondientes a mutantes contruídos mediante doble recombinación en Pto DC3000	86
Figura 14. Susceptibilidad de diferentes cepas de Pto a flavonoides	90
Figura 15. Análisis de la organización transcripcional de los genes <i>mexAB-oprM</i> en Pto DC3000 mediante RT-PCR.	92
Figura 16. Determinación de los puntos de inicio de la transcripción mediante ensayos de extensión reversa a partir de un cebador	93
Figura 17. Expresión de los promotores de <i>mexAB-oprM</i> y <i>pmeR</i> en presencia de diferentes compuestos antimicrobianos	95
Figura 18. Análisis mediante PCR cuantitativa de los niveles de expresión relativa de <i>mexAB-oprM</i> y <i>pmeR</i> en diferentes cepas de Pto.....	96
Figura 19. Expresión de los promotores de <i>mexAB-oprM</i> y <i>pmeR</i> en Pto DC3000, DC3000R y DC3000A	97
Figura 20. Expresión del promotor <i>pmeR</i> en Pto DC3000 y en el mutante <i>rpoS</i>	98
Figura 21. Inducción de la expresión de la proteína PmeR	100
Figura 22. Perfil de proteínas de las fracciones obtenidas durante la purificación de PmeR	101
Figura 23. Cromatografía analítica de la proteína PmeR.....	102
Figura 24. Unión específica <i>in vitro</i> del represor PmeR a la región intergénica <i>pmeR-mexA</i>	103

Figura 25. Identificación del sitio de unión del represor PmeR en la región intergénica <i>pmeR-mexA</i>	104
Figura 26. Efecto de diferentes sustratos de la bomba MexAB-OprM sobre la unión de PmeR a su operador	106
Figura 27. Identificación de una secuencia repetida e invertida (IR) aguas arriba de <i>pmeR</i>	108
Figura 28. Efecto de la secuencia repetida e invertida (IR) sobre la expresión de <i>pmeR</i>	110
Figura 29. Evolución de las poblaciones bacterianas y desarrollo de síntomas en hojas de tomate.....	112
Figura 30. Curva de crecimiento de las diferentes cepas de Pto: DC3000, DC3000A y DC3000R.....	113
Figura 31. Ensayos de competencia en medio de laboratorio	114
Figura 32. Ensayos de colonización competitiva de diferentes cepas de Pto en hojas de tomate	115
Figura 33. Efecto de los extractos vegetales en la motilidad de Pto DC3000.....	119
Figura 34. Motilidad tipo <i>swimming</i> en de Pto DC3000	120
Figura 35. Efecto de los flavonoides sobre la motilidad tipo <i>swimming</i> en cepas de Pto.	121
Figura 36. Ensayos de motilidad tipo <i>swimming</i> en mutantes de Pto complementados.....	122
Figura 37. Efecto de la floretina en la motilidad tipo <i>swimming</i> en medio mínimo MMF	123
Figura 38. Motilidad tipo <i>swarming</i> en de Pto DC3000	123
Figura 39. Ensayos de motilidad tipo <i>swarming</i> en cepas de Pto.....	124
Figura 40. Ensayos de motilidad tipo <i>swarming</i> en mutantes de Pto complementados.	125
Figura 41. Ensayo de motilidad en mutantes de Pto carentes de flagelo y pili tipo IV	126
Figura 42. Expresión del promotor de <i>mexAB-oprM</i> en Pto DC3000, <i>fleQ</i> , <i>fliC</i> y <i>pilA</i>	128
Figura 43. Influencia de la floretina sobre la abundancia de flagelos en Pto	129
Figura 44. Expresión de <i>fliC</i> en diferentes flavonoides y cepas de Pto	130
Figura 45. Cuantificación del ARNm de <i>fliC</i> mediante RT-PCR cuantitativa.....	131
Figura 46. Producción de flagelina en Pto DC3000 y sus mutantes	133
Figura 47. Expresión relativa de distintos genes flagelares en Pto DC3000.....	134
Figura 48. Expresión de los promotores de <i>fleQ</i> y de <i>flgF</i> en Pto DC3000 y DC3000A	135
Figura 49. Expresión de distintos genes flagelares en MMF	136
Figura 50. Efecto de la floretina sobre la abundancia de FliA.....	137
Figura 51. Análisis de la transcripción de otros genes dependientes de FliA en Pto DC3000.....	138
Figura 52. Ensayos de <i>swarming</i> con el mutante <i>gacA</i>	139
Figura 53. Ensayos de <i>swimming</i> con el mutante <i>gacA</i>	140
Figura 54. Efecto de la floretina sobre la expresión de <i>fliC</i> en el mutante <i>gacA</i>	140
Figura 55. Niveles de FliC y FliA en las cepas silvestre y en el mutante <i>gacA</i>	141
Figura 56. Expresión del sistema de secreción tipo III en condiciones de inducción.....	143
Figura 57. Ensayos de auto-aglutinación.....	144

Figura 58. Secuencia de las proteínas RsmA y de los ARNs de pequeño tamaño <i>rsm</i> de Pto DC3000.....	145
Figura 59. Niveles de <i>rsmY</i> y <i>rsmZ</i> en diferentes mutantes de Pto	146
Figura 60. Representación del modo de unión de PmeR a su región operadora	152
Figura 61. Modelo de acción de los flavonoides en Pto DC3000.....	159

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fenotipos controlados por el sistema de dos componentes GacS/GacA en <i>P. syringae</i>	19
Tabla 2. Proteínas homólogas a los componentes de la bomba MexAB-OprM de Pto DC3000.....	30
Tabla 3. Cepas bacterianas.....	41
Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo.	42
Tabla 5. Plásmidos construidos en este trabajo	42
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos por PCR	45
Tabla 7. Composición de medios utilizados en este estudio	47
Tabla 8. Antibióticos utilizados en este estudio.....	48
Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de extensión.....	66
Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR.....	67
Tabla 11. Cebadores utilizados para la cuantificación de los transcritos	71
Tabla 12. Susceptibilidad de la cepa Pto DC3000 y el mutante DC3000A a diferentes compuestos antimicrobianos.....	87
Tabla 13. Perfil de susceptibilidad a compuestos antimicrobianos de Pto DC3000 y DC3000 Δ mexAB-oprM	88
Tabla 14. Susceptibilidad de la cepa Pto DC3000 y el mutante DC3000R a diferentes compuestos antimicrobianos.....	89
Tabla 15. Susceptibilidad de la cepa Pto DC3000 y mutantes carentes de flagelo y pili tipo IV a diferentes compuestos antimicrobianos.....	127
Tabla 16. Estructura de los sustratos de la bomba MexAB-OprM, inductores de su expresión y efectores de PmeR ensayados en este trabajo	154
Tabla 17. Concentración de los compuestos utilizados en este trabajo	197

ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>	IAA	<i>Indole-3-acetic acid</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico	IPTG	1-isopropil- β -D-1 galactopiranosido
ADNc	ADN complementario	IR	Secuencia repetida e invertida
AHLs	<i>N</i> -acil-homoserina lactonas	kb	kilo base
Ap	Ampicilina	kD	kilo Dalton
ARN	Ácido ribonucleico	Km	Kanamicina
ARNm	ARN mensajero	M	Molar
ARNt	ARN de transferencia	MATE	<i>Multidrug and toxic compounds extrusion</i>
ATP	Adenosin trifostato	MDR	Multirresistencia
Avr	Avirulencia	MFP	<i>Membrane fusion protein</i>
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato	MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
BPB	Butil parabeno	mg	Miligramos
Cat	Catequina	MIC	Concentración inhibitoria mínima
Cm	Cloranfenicol	ml	Mililitros
cm	Centímetros	mm	Milímetros
cpm	Centelleos por minuto	mM	Milimolar
CRP	<i>cAMP-receptor protein</i>	MMF	Medio mínimo inductor del T3SS
Ct	Ciclo umbral	Mo	Morina
DC3000A	Mutante <i>mexAB-oprM</i>	MPB	Metil parabeno
DC3000R	Mutante <i>pmeR</i>	Nal	Ácido nalidixico
DEPC	Dietilpirocarbonato	Nar	Naringenina
DMS	Dimetilsulfato	NBT	Azul de nitrotetrazolio
DMSO	Dimetil sulfóxido	nM	Nanomolar
DO	Densidad óptica	OMF	<i>Outer membrane factor</i>
dNTPs	Desoxinucleótidos trifostato	ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- β -D-galactopiranosido
dpi	Días post-inoculación	ORF	Marco abierto de lectura
DTT	Di-tiotreitol	pb	pares de bases
ECF	<i>Extracytoplasmic function</i>	PCR	Reacción en cadena con ADN polimerasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	PAI	Isla de patogenicidad
EPS	Polisacáridos extracelulares	PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>	$P_{mexAB-oprM}$	Promotor del operón <i>mexAB-oprM</i>
Flo	Floretina	P_{pmeR}	Promotor de <i>pmeR</i>
Flz	Floridzina	$P_{pmeR-IR}$	Promotor de <i>pmeR</i> sin la IR
g	gramos	PNK	Polinucleótido quinasa
g	gravidades	Pph	<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
Gm	Gentamicina	Pto	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>
Gen R	Gen de Resistencia	Psy	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
GFP	Green Fluorescent Protein	pv.	Patovar
h	Horas	PVDF	Polifluoruro de vinilideno
HK	Histidina quinasa	p/v	Peso/volumen
Hop	<i>Hrp outer protein</i>	qRT-PCR	PCR para la cuantificación de la expresión génica relativa
HR	Respuesta de hipersensibilidad	Quer	Quercetina
<i>hrp/hrc</i>	<i>hypersensitive response and pathogenicity/conserved</i>		
HTH	<i>Helix-turn-helix</i>		

RBS	Sitio de unión del ribosoma	TEM	Microscopio electrónico de transmisión
Rif	Rifampicina		
RND	<i>Resistance, nodulation, cell division</i>	TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
RR	Regulador de respuesta	T_m	Temperatura de fusión del ADN
Rsm	<i>Regulator of secondary metabolism</i>	T3SS	Sistema de secreción tipo 3
RT-PCR	PCR acoplada a una reacción de transcripción reversa	ufc	unidad formadora de colonia
SDS	Dodecil sulfato sódico	UM	Unidades Miller
SDS-PAGE	Electroforesis en gel poliacrilamida en presencia de SDS	UV	Ultravioleta
Sm	Estreptomina	μg	Microgramos
SMR	<i>Small multidrug resistance</i>	μl	Microlitros
Spc	Espectinomina	μM	Micromolar
TBE	Tampón Tris-Borato-EDTA	v/v	Volumen/volumen
TAE	Tampón Tris-Acetato-EDTA	WT	Cepa silvestre
Tc	Tetraciclina	X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
TE	Tampón Tris-EDTA	$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados

INTRODUCCIÓN

1. *Pseudomonas syringae*

Las bacterias del género *Pseudomonas* se clasifican filogenéticamente dentro del grupo γ -proteobacteria como bacilos Gram-negativos, quimiorganotróficos, aerobios y móviles, con flagelos generalmente polares (Palleroni, 1984). Son muy versátiles desde el punto de vista metabólico ya que pueden utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía, colonizan nichos ecológicos diversos y se encuentran ampliamente distribuidas en suelos y aguas (Palleroni, 1984). Asimismo, las especies del género *Pseudomonas* poseen distintos modos de vida: hay cepas patógenas oportunistas de animales y humanos implicadas normalmente en infecciones nosocomiales, como *Pseudomonas aeruginosa*, hay cepas patógenas de plantas de importancia en agricultura, como *Pseudomonas syringae*, y cepas que estimulan el crecimiento de plantas y/o que son empleadas en procesos de biorremediación, como *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas putida* (Silby *et al.*, 2011).

Las *P. syringae* son bacterias que se pueden encontrar viviendo de forma epifita en la superficie de las hojas o produciendo diversas enfermedades en plantas de interés agrícola y económico. *P. syringae* fue inicialmente aislada de una planta de lila (*Syringa vulgaris*) con síntomas de enfermedad en 1899 por M. W. Beijerinck y posteriormente caracterizada y nombrada por C.J.J. van Hall. Las bacterias pertenecientes a este grupo infectan una gran variedad de plantas, tanto herbáceas como leñosas, causando síntomas diversos (manchas y necrosis en hojas, podredumbre en frutos, tumores y chancros en tallos, etc.) que dependen del tipo de planta, del sitio de infección y del patovar bacteriano (Hirano y Upper, 2000). Como patógeno, *P. syringae* entra en la planta a través de heridas o por los estomas de las hojas, se multiplica en el espacio intercelular (apoplasto) y con el tiempo produce lesiones necróticas que frecuentemente están rodeadas por halos de clorosis (Hirano y Upper, 2000). Debido a su importancia como patógeno, las cepas de este género han sido objeto de numerosos estudios, especialmente sobre su epidemiología y mecanismos de virulencia.

La especie *P. syringae* se divide en al menos 50 variedades patogénicas o patovares (pvs.) que se distinguen fenotípicamente y genéticamente, por su patogenicidad y rango de hospedador. Sin embargo, los resultados de hibridaciones ADN-ADN y la secuenciación de genes esenciales han establecido la división de *P. syringae* en al menos nueve genomoespecies (Gardan *et al.*, 1999; Sarkar y Guttman, 2004). Dentro de esta clasificación, *P. syringae* pv. tomato (Pto) pertenece a la genomoespecie 3, denominada también "tomato". Otros patovares incluidos en este grupo son persicae, antirrhini, maculicola, viburni, apii, delphinii, passiflorae, philadelphi, ribicola, y primulae (Cai *et al.*, 2011; Gardan

et al., 1999). En el presente trabajo, se utilizarán los términos “complejo *P. syringae*” o “*P. syringae*”, para referirnos a las nueve genomoespecies como un todo.

Al inicio de esta tesis estaba disponible la secuencia completa de los genomas de tres patovares de *P. syringae*: pv. phaseolicola (Pph) (Joardar *et al.*, 2005), pv. syringae (Psy) (Feil *et al.*, 2005) y pv. tomato (Pto) (Buell *et al.*, 2003), causantes de la grasa y el moteado de la judía y el moteado del tomate, respectivamente. En la actualidad, se encuentran disponibles los genomas cerrados, parciales y en proceso de ensamblaje, de al menos 35 patovares de *P. syringae* (revisado en www.pseudomonas-syringae.org y NCBI). El análisis del pangenoma de *P. syringae* está permitiendo caracterizar no sólo los componentes conservados en el genoma núcleo (*core genome*), sino también todos aquellos genes presentes únicamente en algunos patovares y que probablemente puedan determinar la especificidad de hospedador (Almeida *et al.*, 2009; Baltrus *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2011; Feil *et al.*, 2005; Joardar *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2011; Studholme, 2011).

2. Características de *P. syringae* que facilitan su adaptación a la filosfera

La filosfera es un ambiente adverso para los microorganismos que la habitan debido a que la disponibilidad de nutrientes es limitada y a los cambios rápidos y frecuentes que tienen lugar en ella de temperatura, humedad y radiación ultravioleta. Sin embargo, *P. syringae* es bastante resistente a distintos tipos de estreses abióticos gracias a diversos mecanismos (Figura 1). La tolerancia a radiación UV está mediada por el sistema RulAB y por otros sistemas de reparación del ADN, pero no por la producción de pigmentos (Dulla *et al.*, 2005; Gunasekera y Sundin, 2006; Kim y Sundin, 2000; Sundin y Murillo, 1999). En Pto DC3000, los pili tipo IV tienen un papel importante en el crecimiento epifítico y la tolerancia a radiación UV en la superficie de las hojas (Roine *et al.*, 1998).

Debido a la naturaleza hidrofóbica de la cutícula, es probable que la producción de compuestos surfactantes por las bacterias permita la solubilización y difusión de sustratos y facilite el movimiento de las mismas en la superficie de las hojas (Burch *et al.*, 2012; Lindow y Brandl, 2003; Schreiber *et al.*, 2005). En *P. syringae* pv. syringae se ha demostrado que la siringomicina, además de ser un importante factor de virulencia, es un potente tensoactivo en cepas no patógenas, lo que les permite modificar el microhábitat de la hoja (Lindow y Brandl, 2003).

La motilidad mediada por flagelos y la adherencia estable de las bacterias a la superficie de la hoja también son importantes en las primeras etapas de la colonización en algunos patovares de *P. syringae*. Así, se ha demostrado que mutantes con motilidad reducida o inmóviles están afectados en el crecimiento, supervivencia y/o competencia sobre la superficie de las hojas en comparación con las

cepas móviles (Haefele y Lindow, 1987; Hattermann y Ries, 1989; Hirano y Upper, 2000; Ichinose *et al.*, 2003). Esto se debe a que los flagelos permiten a las bacterias localizar nutrientes, acceder a sitios protegidos del estrés ambiental, colonizar los tejidos vegetales y, posteriormente, dispersarse de nuevo en el medio ambiente (Melotto *et al.*, 2006; Ottemann y Miller, 1997). En *P. syringae* la adhesión a la superficie de la hoja dependiente de pili tipo IV juega un papel importante en su supervivencia y en la colonización, ya que las poblaciones en hoja de mutantes deficientes en pili tipo IV suelen ser significativamente menores que las de la cepa silvestre (Roine *et al.*, 1998; Romantschuk *et al.*, 1993; Suoniemi *et al.*, 1995). En el pv. tabaci, los pili tipo IV no solo contribuyen a la supervivencia, sino que también son un importante factor de virulencia (Nguyen *et al.*, 2012; Taguchi y Ichinose, 2011).

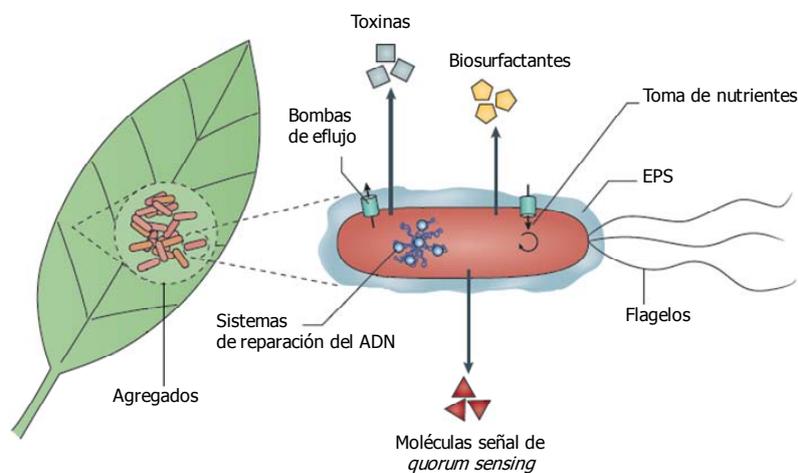


Figura 1. Características de *P. syringae* que mejoran su adaptación a la filosfera.

P. syringae es resistente a distintos tipos de estreses abióticos gracias a diversos mecanismos: la síntesis de polisacáridos extracelulares (EPSs), que protegen a las células de la desecación y ayudan a la formación de agregados; la producción de biosurfactantes, que permiten la solubilización de sustratos y facilitan el movimiento de las bacterias; los sistemas de reparación de ADN, como protección frente a la radiación. Asimismo, las bombas de eflujo permiten a la bacteria eliminar compuestos tóxicos producidos por la planta o por otras bacterias epifitas. La expresión de distintos sistemas para la captación de nutrientes, la motilidad flagelar y la detección de moléculas implicadas en *quorum sensing*, son también características importantes para la colonización de la planta hospedadora. Por otra parte, la bacteria produce toxinas que le permiten manipular el metabolismo y/o la señalización de la planta, llegando a ser cruciales para el proceso de infección (Dulla *et al.*, 2005; Hirano y Upper, 2000; Lindow y Brandl, 2003). Modificado de Vorholt (2012).

La formación de agregados o microcolonias en las hojas de las plantas permite a las bacterias modificar su entorno, mejorando sus posibilidades de supervivencia en la filosfera. Varios estudios han demostrado que *P. syringae* no se encuentra en la hoja como células aisladas sino formando agregados, en los que el tamaño está directamente relacionado con una mayor resistencia a la desecación (Monier y Lindow, 2003, 2004). Así se puso de manifiesto que algunas características de *P. syringae* son dependientes de la densidad celular, es decir, de *quorum sensing*. Quiñones *et al.* (2005) demostraron que el sistema AhII-AhIR y el regulador AefR eran reguladores que estimulaban la

producción de polisacáridos extracelulares (EPS, *exopolysaccharide*), la tolerancia al estrés oxidativo y la maceración del tejido vegetal. En *P. syringae* pv. *syringae*, el alginato es importante para la vida epifítica y como factor de virulencia, ya que protege a las bacterias de la desecación y de las especies reactivas de oxígeno, actúa como amortiguador de los cambios osmóticos y provoca lesiones acuosas en los tejidos (Keith *et al.*, 2003; Quiñones *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 1999).

Por otra parte, las bacterias del complejo *P. syringae* han adaptado su metabolismo a las condiciones del apoplasto vegetal siendo capaces de utilizar un número restringido de azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos (Rico y Preston, 2008). La presencia de numerosos transportadores de tipo ABC en *P. syringae*, incluyendo aquellos involucrados en la captación de mono, disacáridos y aminoácidos, sugiere que son necesarios para acceder a nutrientes que pueden ser limitantes en esas condiciones (Vorholt, 2012).

3. Factores de virulencia de *P. syringae*

Las bacterias fitopatógenas poseen factores de virulencia que alteran y/o suprimen las defensas del hospedador de modo que pueden obtener nutrientes a la vez que inducen los síntomas en la planta (Abramovitch y Martin, 2004; Nomura *et al.*, 2005). La capacidad de *P. syringae* para multiplicarse en hospedadores susceptibles causando la enfermedad o para provocar una respuesta de defensa rápida y localizada, conocida como respuesta hipersensible (HR, *hypersensitive response*), en plantas no hospedadoras y resistentes, es dependiente del sistema de secreción tipo III (T3SS, *type 3 secretion system*), que es el principal determinante de virulencia en *P. syringae* (Hirano y Upper, 2000; Lindeberg *et al.*, 2006; Marco *et al.*, 2005).

3.1. El sistema de secreción tipo III

El sistema de secreción tipo III (T3SS) es una maquinaria de secreción especializada utilizada por numerosas bacterias Gram-negativas patógenas de plantas y animales que permite a la bacteria inyectar proteínas (efectores) directamente en el citoplasma de las células del hospedador o en el espacio intercelular (Alfano y Collmer, 2004). Una vez allí, los efectores provocan la enfermedad alterando y/o suprimiendo las respuestas de defensa a diferentes niveles, o desencadenan una respuesta inmune exitosa si son reconocidos por las proteínas de resistencia (Jones y Dangl, 2006). La maquinaria de secreción de tipo III en los fitopatógenos se denomina sistema *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*) y *P. syringae* pv. *phaseolicola* fue la primera bacteria en la que se identificó el T3SS como determinante esencial de patogénesis (Lindgren *et al.*, 1986).

El T3SS es una jeringa molecular que consiste en un aparato de translocación de membrana formado por dos anillos (interior y exterior) y un filamento, llamado *pilus*, que sobresale de la célula (Figura 2) (Hueck, 1998; Jin *et al.*, 2001; Kubori *et al.*, 1998). El *pilus* tipo III tiene un diámetro de 6-8 nm de diámetro y su ensamblaje en la superficie de la célula depende del T3SS. Es necesario para la secreción en medio de cultivo y para la transferencia de los efectores a las células vegetales, ya que funciona como un conducto por el que se transportan (Jin y He, 2001; Jin *et al.*, 2001; Roine *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 2000). La proteína estructural del *pilus* Hrp es HrpA, que muestra un alto grado de divergencia entre patovares, lo que parece ser consecuencia de su localización extracelular y de la presión selectiva a la que está sometida para evadir los mecanismos de detección de cada planta (Preston, 2000; Roine *et al.*, 1997). Morfológicamente el *pilus* Hrp parece ser más largo y flexible que el de los patógenos animales, lo que probablemente es necesario en los fitopatógenos para atravesar la gruesa pared celular de la célula vegetal (Büttner y He, 2009; Ramos *et al.*, 2007).

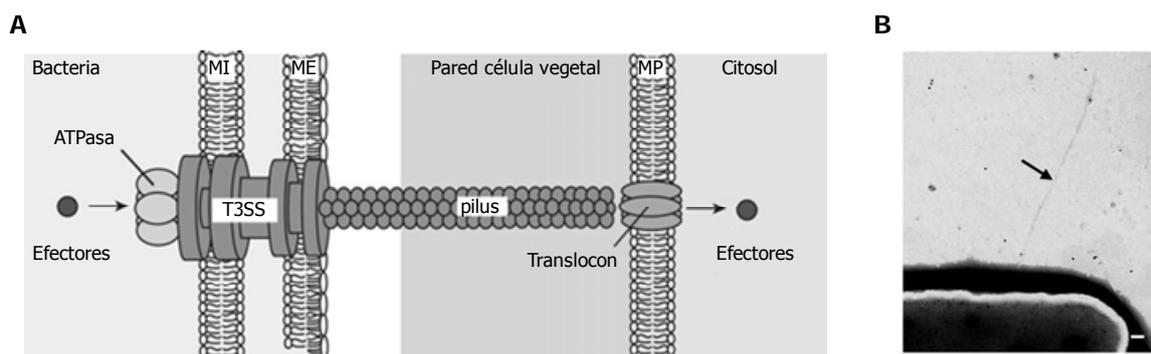


Figura 2. Sistema de secreción tipo III y *pilus* Hrp.

A. Representación esquemática del T3SS de una bacteria fitopatógena. El sistema de secreción, asociado con una ATPasa citoplasmática, atraviesa las dos membranas bacterianas y está conectado al *pilus* (extracelular) que sirve como canal de transporte de las proteínas secretadas (efectores). El translocón forma un canal de proteínas en la membrana citoplasmática de la célula vegetal y permite la entrada de los efectores en el citosol de la célula del hospedador. MI, membrana interna; ME, membrana externa; PM, membrana plasmática. Modificado de Büttner y He (2009).

B. *Pilus* Hrp. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de células de Pto DC3000 cultivadas en medio inductor de *hrp*. La flecha señala el *pilus* Hrp y la escala representa 100 nm. Imagen tomada de Jin y He (2001).

El T3SS está codificado en el cluster génico *hrp/hrc* (*hypersensitive response and pathogenicity / hrp conserved*), de aproximadamente 25 kb. En *P. syringae* los genes *hrp/hrc* suelen tener adyacentes genes que codifican efectores y se localizan en una isla de patogenicidad (PAI, *pathogenicity island*) que está claramente definida en el genoma y flanqueada por ARN_t o por elementos genéticos móviles (Figura 3) (Alfano *et al.*, 2000). La región central conservada de la PAI Hrp incluye 7 operones, que contienen 26 genes que codifican el T3SS y sus reguladores. Las proteínas codificadas por los genes *hrc* son los componentes universales del sistema de secreción (altamente conservados en diversos

patógenos de plantas y animales) y forman el núcleo del cuerpo basal del aparato de secreción, que está localizado en la membrana interna bacteriana o en el citoplasma débilmente asociado con la membrana (Alfano *et al.*, 2000; Galán y Collmer, 1999). Según la estructura del operón *hrp* y del sistema de regulación, los T3SS de las bacterias fitopatógenas se clasifican en dos grupos: grupo I, al que pertenecen *P. syringae*, *Erwinia* spp. y *Pantoea stewartii*, y grupo II, al que pertenecen *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas* spp. (Alfano y Collmer, 1997; Tang *et al.*, 2006). Ocho de las proteínas Hrc son muy similares en secuencia a los componentes del cuerpo basal flagelar y se localizan en la superficie de la membrana interna, formando un complejo conservado similar al sistema de exportación de la flagelina. HrcC es la única que no tiene homólogo entre las proteínas flagelares, pertenece a la superfamilia de proteínas de membrana externa PulD/pIV y funciona como una proteína formadora de poros en la membrana externa (Alfano y Collmer, 1997; Tampakaki *et al.*, 2010).

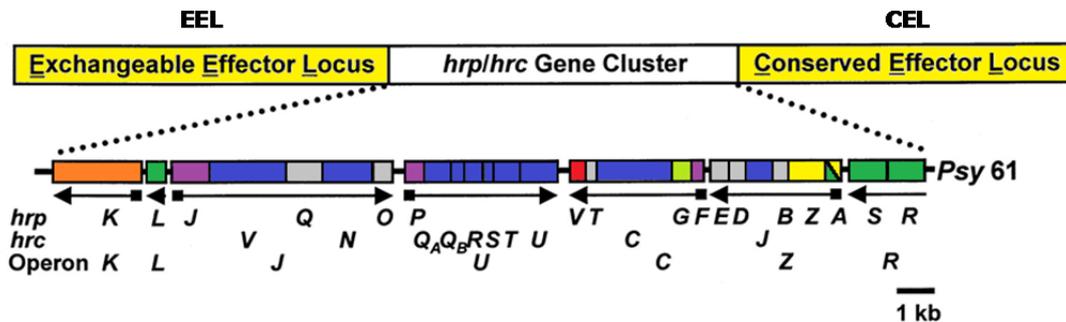


Figura 3. Organización genética de la isla de patogenicidad Hrp de *P. syringae*.

La PAI Hrp se organiza en tres partes: la región central (genes *hrp/hrc*), que abarca aproximadamente 25 kb y está conservada en las PAIs de *P. syringae* pv. *syringae* 61, B728a y pv. *tomato* DC3000, contiene los genes que codifican para el T3SS y su regulación. Adyacentes se encuentran las regiones EEL (*exchangeable effector locus*) y CEL (*conserved effector locus*), que codifican proteínas que se secretan a través del T3SS. En la parte inferior de la figura se muestran los nombres de los genes y de los operones. Las flechas indican el sentido de la transcripción y los cuadrados la presencia de una caja *hrp* en los promotores dependientes de HrpL. Los otros genes codifican proteínas reguladoras (control positivo, verde y control negativo, rojo), los componentes Hrc asociados a la maquinaria del T3SS (azul), proteínas secretadas (amarillo), la proteína del translocón (naranja), proteínas reguladoras o que contribuyen a la secreción (violeta), y proteínas de función desconocida (gris). Las regiones EEL y CEL son de tamaño variable y no están representadas a escala. Modificado de Alfano *et al.* (2000).

Las proteínas que se translocan a través del T3SS de *P. syringae* se llaman Hop (*Hrp outer protein*). Algunas proteínas Hop se secretan en el espacio intercelular y funcionan como proteínas accesorias mientras que otras se secretan en el interior de las células hospedadoras donde actúan; estas últimas son las denominadas efectores (Alfano y Collmer, 2004). Algunos genes que codifican efectores se denominaron *avr* porque se identificaron inicialmente como proteínas que determinaban un fenotipo de avirulencia (resistencia) en plantas hospedadoras (Galán y Collmer, 1999; Leach y White, 1996). En presencia de los genes R en plantas resistentes, las proteínas Avr desencadenan la

respuesta hipersensible (HR), una muerte celular programada rápida y localizada asociada con respuestas defensivas que, en la mayoría de los casos, limita el crecimiento y la propagación del patógeno desde el sitio de infección. Por el contrario, en las plantas susceptibles, que carecen de los correspondientes genes R, los efectores del T3SS funcionan como determinantes de virulencia, ya que dentro de las células vegetales los efectores interfieren con las rutas de señalización de defensa, suprimen las respuestas de resistencia (como la HR) y modulan la fisiología celular con objeto de favorecer el crecimiento y la multiplicación del patógeno, lo que desencadena la enfermedad (Alfano y Collmer, 2004; Jones y Dangl, 2006; Oguiza y Asensio, 2005).

Algunos efectores requieren chaperonas, que son proteínas pequeñas, ácidas, de localización citoplasmática y con una región anfipática en su extremo C-terminal. Durante la secreción, las chaperonas se unen específicamente a los efectores entre los residuos 15 a 150 actuando de distintas maneras: mantienen las proteínas efectoras desplegadas o parcialmente desplegadas; protegen las proteínas efectoras de la interacción prematura entre sí o con otras proteínas, evitando la agregación o la proteólisis de los efectores en el citoplasma bacteriano, o bien funcionan como señales de secreción para dirigir el efector al aparato tipo III (Feldman y Cornelis, 2003; Losada y Hutcheson, 2005).

3.1.1. Regulación de la expresión del T3SS en *P. syringae*

Como se mencionó anteriormente, los genes que codifican los componentes del sistema de secreción tipo III y algunos efectores están agrupados en la PAI Hrp, pero la mayoría de efectores están dispersos en el genoma o localizados en plásmidos (Alfano *et al.*, 2000; Buell *et al.*, 2003). A pesar de su diferente ubicación, la expresión de todos ellos está coordinada y sometida a un estricto control que responde a señales ambientales. Estos genes se expresan a niveles muy bajos en medios ricos en aminoácidos y se inducen durante la patogénesis, tras el contacto con las células hospedadoras (Wei *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 1994; Xiao *et al.*, 1992) o en presencia de medios mínimos de composición definida que simulan las condiciones de la planta (Lindgren *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 1992). Un ejemplo es el medio mínimo inductor de *hrp* (denominado MMF) que tiene una baja fuerza osmótica, un pH de aproximadamente 5.8 y está suplementado con azúcares simples, como la fructosa (Hutcheson *et al.*, 2001; Huynh *et al.*, 1989; Rahme *et al.*, 1992).

La regulación del T3SS depende de HrpL, un factor sigma alternativo de la ARN polimerasa que pertenece a la familia ECF (*extracytoplasmic function*) (Ferreira *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 1994; Xiao y Hutcheson, 1994; Zwiesler-Vollick *et al.*, 2002). HrpL activa los genes del T3SS en respuesta a las condiciones de inducción reconociendo una secuencia consenso denominada “caja *hrp*” que está ubicada aguas arriba de los genes que controla (Fouts *et al.*, 2002; Xiao y Hutcheson, 1994). La

transcripción del gen *hrpL* es, a su vez, dependiente del factor sigma alternativo σ^{54} (RpoN) y de las proteínas HrpR y HrpS (Figura 4), dos activadores transcripcionales pertenecientes a la familia de NtrC (Alarcon-Chaidez *et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2003; Grimm *et al.*, 1995; Hendrickson *et al.*, 2000a; Hendrickson *et al.*, 2000b; Hutcheson *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 1994). Tanto HrpR como HrpS portan un motivo para interactuar con el complejo σ^{54} -ARN polimerasa y un dominio de unión al ADN pero, a diferencia de la mayoría de las proteínas reguladoras de la familia, carecen del dominio receptor que se fosforila por acción de un regulador de respuesta (Hutcheson *et al.*, 2001; Jovanovic *et al.*, 2011). La activación máxima de *hrpL* requiere que ambas proteínas se unan como heterodímero a su promotor (Hutcheson *et al.*, 2001). En *P. syringae* el mecanismo por el cual HrpR y HrpS regulan la transcripción de *hrpL* difiere entre cepas. En *P. syringae* pv. *syringae* 61 y pv. *tomato* DC3000, *hrpR* y *hrpS* se expresan como un operón a partir de un promotor situado por encima de *hrpR* (Hutcheson *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 1994). Además, la transcripción de *hrpRS* está regulada por HrpA, ya que en un mutante carente de *hrpA*, la transcripción del operón *hrpRS*, *hrpL* y otros genes del T3SS se reduce drásticamente, pero el mecanismo por el que HrpA regula esos genes es desconocido hasta el momento (Wei *et al.*, 2000) (Figura 4).

Estudios recientes han demostrado que la función de HrpS está regulada por HrpV y HrpG (Wei *et al.*, 2000). HrpV es un regulador negativo de los genes del T3SS en condiciones de inducción, de modo que su delección provoca un aumento de la expresión de varios operones *hrp/hrc* y su hiperproducción el efecto contrario (Preston *et al.*, 1998). HrpG es una chaperona que desreprime la expresión de los genes del T3SS en una cepa que sobreexpresa HrpV sin afectar la transcripción de *hrpV*. Se ha demostrado que HrpV interactúa con HrpS y HrpG *in vivo*, por lo que es probable que HrpG suprima el efecto de HrpV interactuando con ella y liberando a HrpS en condiciones de inducción (Wei *et al.*, 2005).

La proteólisis de HrpR por la proteasa Lon proporciona un mecanismo adicional de regulación ambiental de la expresión de *hrpL* y del T3SS (Figura 4). Determinadas condiciones que imitan las que se dan en el apoplasto vegetal, suprimen la degradación de HrpR mediada por Lon, permitiendo así la formación del complejo HrpR/HrpS y la inducción de la expresión de *hrpL* (Bretz *et al.*, 2002; Lan *et al.*, 2007; Ortiz-Martín *et al.*, 2010; Tsilibaris *et al.*, 2006). Asimismo, se ha demostrado que la proteasa Lon regula la estabilidad de determinados efectores del T3SS en *P. syringae* (Losada y Hutcheson, 2005).

La expresión del T3SS también se encuentra regulada a nivel global a través del sistema de dos componentes GacS/GacA. En un mutante de Pto DC3000 carente de *gacA* se observó una reducción significativa de los niveles de ARNm de *hrpRS*, *hrpL* y *rpoN* (Chatterjee *et al.*, 2003).

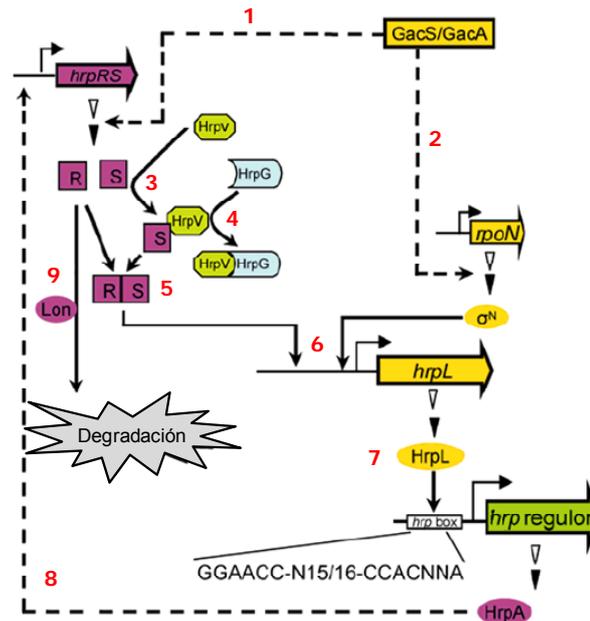


Figura 4. Modelo de regulación de los genes *hrp/hrc* en *P. syringae*.

Las señales provenientes de la planta o de un medio inductor de *hrp* activan la expresión de los genes *hrpRS*. Esta inducción parece estar mediada en parte por el sistema de dos componentes GacS/GacA (1), que también activa *rpoN* a nivel post-transcripcional (2). HrpV inhibe la acción de HrpS a través de una interacción proteína-proteína (3). HrpG, por el contrario, interacciona con HrpV para liberar a HrpS (4). HrpS y HrpR forman un heterodímero (5) activando la transcripción de *hrpL*, que es dependiente del complejo RpoN-ARN-polimerasa (6). HrpL reconoce la caja *hrp* en la región promotora de los genes *hrp/hrc* activando la expresión del T3SS, de modo que se forma un aparato de secreción funcional que moviliza los efectores (7). HrpA tiene un efecto positivo sobre la transcripción de *hrpRS*, estimulando la expresión del T3SS (8). Bajo condiciones represoras (p. ej., en medio rico), los niveles de HrpR se mantienen bajos debido a su degradación por Lon (9); en condiciones de inducción, sin embargo, la alta expresión de *hrpR* garantiza unos niveles de proteína suficientes para activar el sistema, a pesar de que Lon mantiene su actividad degradativa. Modificado de Tang *et al.* (2006).

3.2. Producción de toxinas

El T3SS no es el único factor de virulencia del que se vale *P. syringae* para desencadenar la enfermedad; la producción de diferentes toxinas también contribuye en el proceso infeccioso. Las fitotoxinas de *P. syringae* son péptidos no ribosomales sintetizados por enzimas específicas (revisado en Bender *et al.*, 1999). La estructura anfipática de los lipopéptidos siringomicina y siringopeptina facilita su inserción en la bicapa lipídica de las membranas de las células vegetales y la formación de poros que incrementan la permeabilidad a los cationes y la pérdida del potencial de membrana, lo que conduce a la muerte celular y a la necrosis del tejido afectado (Bender *et al.*, 1999; Hutchison y Gross, 1997). Otras toxinas como la faseolotoxina, la tabtoxina o la mangotoxina inducen clorosis actuando sobre rutas metabólicas específicas del hospedador. La faseolotoxina inhibe la ornitina carbamoiltransferasa, una enzima clave en el ciclo de la urea, la tabtoxina inhibe la glutamina sintetasa, esencial para la síntesis de glutamina y la eliminación de amonio, y la mangotoxina inhibe la ornitina acetiltransferasa, clave en la ruta biosintética de la ornitina y arginina (Arrebola *et al.*, 2009; Bender *et*

al., 1999). Recientemente, se han descrito otras toxinas pertenecientes al grupo de las siringofactinas que tienen actividad surfactante y son necesarias para la motilidad tipo *swarming* (Berti *et al.*, 2007; Lindeberg *et al.*, 2008).

Determinadas fitotoxinas también pueden imitar la acción de las hormonas vegetales manipulando distintas rutas de señalización de la planta con el fin de acceder a nutrientes y contrarrestar las respuestas de defensa. *P. syringae* pv. tomato produce coronatina, una toxina que afecta la señalización mediada por el ácido jasmónico y que promueve la apertura de los estomas para la entrada de las bacterias, el crecimiento bacteriano en el apoplasto, la susceptibilidad sistémica y el desarrollo de síntomas, manifestados como clorosis (Bender *et al.*, 1999; Melotto *et al.*, 2006).

3.3. Motilidad

La motilidad bacteriana es un factor de virulencia muy importante, ya que permite a la bacteria dirigirse hacia entornos favorables y escapar de condiciones adversas, incrementando su competitividad en el ambiente. Está implicada en varios procesos como las respuestas tácticas (quimiotaxis, aerotaxis, etc), la colonización de los hospedadores, la formación de biopelículas, el desarrollo bacteriano y su dispersión. El flagelo es uno de los orgánulos de locomoción más complejos y efectivos, capaz de propulsar a las bacterias en medios líquidos (motilidad tipo *swimming*) y sobre superficies o a través de ambientes viscosos (motilidad tipo *swarming*). Adicionalmente, los flagelos desempeñan un papel importante en la adhesión a sustratos, la formación de biopelículas y contribuyen al proceso de virulencia en bacterias patógenas (Mahajan *et al.*, 2009; Merino *et al.*, 2006; Ottemann y Miller, 1997; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007).

3.3.1. Estructura del flagelo

El flagelo bacteriano está formado por más de 20 proteínas diferentes y requiere al menos otras 30 para su regulación y ensamblaje (Macnab, 2003). Si bien existen algunas diferencias, todos los flagelos bacterianos constan de una estructura básica (Figura 5) en la que se pueden distinguir tres partes: (1) el cuerpo basal, que ancla el flagelo a la envoltura celular bacteriana y contiene el motor que provocará la rotación del flagelo, (2) el gancho o codo, que es un cilindro curvado y flexible que convierte el movimiento de rotación en ondas, y (3) el filamento, un tubo hueco constituido por hasta 20.000 subunidades de una proteína mayoritaria denominada flagelina que propaga las ondas iniciadas por el gancho y empuja la bacteria contra el medio que la rodea para propulsarla hacia adelante (Bardy *et al.*, 2003; Smith y Hoover, 2009).

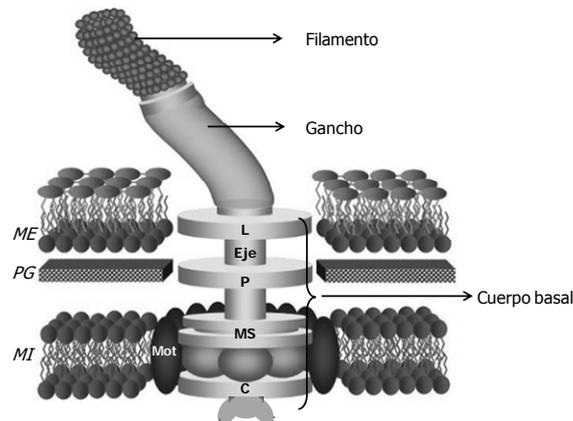


Figura 5. Esquema de los principales componentes del flagelo.

El filamento es un tubo hueco helicoidal que presenta una curvatura por fuera de la membrana externa, denominado codo o gancho, que convierte el movimiento giratorio del eje en helicoidal. El eje se extiende entre el gancho y el cuerpo basal, pasando a través de varios anillos de proteínas en las membranas celulares que actúan como cojinetes. El cuerpo basal está conformado por los anillos (C, MS, P y L), el eje, los complejos de proteínas del motor (Mot) y el aparato de exportación flagelar (bajo el anillo C). ME, membrana externa; PG, peptidoglicano y MI, membrana interna.

El cuerpo basal está embebido en las envueltas bacterianas (membrana citoplasmática y pared celular), consta de un eje que atraviesa 1 o 2 parejas de anillos y otras subestructuras, tiene como función anclar el flagelo a la célula (Figura 5), suministrar el mecanismo del movimiento (un motor rotatorio que puede girar en ambos sentidos) y albergar la maquinaria de exportación de proteínas para su ensamblaje (Macnab, 2003). En el cuerpo basal de las bacterias Gram-negativas se distinguen 4 anillos: el anillo L, que se asocia con la membrana externa (lipopolisacáridos); el anillo P, que se asocia con la pared celular (capa de peptidoglicano); el anillo MS, que se inserta en la membrana plasmática, y el anillo C, que se une también a la membrana pero por el lado citoplasmático. El eje del rotor, está fuertemente asociado con el anillo MS y se extiende hasta el gancho, actuando como eje de transmisión. El motor, está compuesto por el rotor (anillo C formado por 3 proteínas: FliG, FliM y FliN, implicadas en el cambio de sentido del giro del motor ya sea a favor o en contra de las agujas del reloj), y el estator, que rodea al rotor y está formado por múltiples copias de MotA y MotB (Figura 5). Por último, el sistema de secreción tipo III, situado dentro del canal central en el anillo MS, transporta la mayoría de las proteínas flagelares localizadas en el exterior celular (Minamino y Macnab, 1999). La energía necesaria para la secreción no proviene de la hidrólisis de ATP sino de la fuerza protón-motriz, generada por la entrada de protones al citoplasma a través de un espacio entre los anillos MS y C (Terashima *et al.*, 2008).

El gancho o codo es una estructura curvada y flexible que conecta el filamento al cuerpo basal y consta de unas 130 unidades de una proteína (FlgE) de longitud controlada (Figura 5). La arquitectura de esta estructura permite que actúe como una bisagra flexible capaz de transmitir la fuerza de torsión generada en el motor al filamento (Bardy *et al.*, 2003; Terashima *et al.*, 2008).

El filamento es una estructura helicoidal de unos 20 nm de diámetro y longitud variable, compuesto de miles de copias de una única proteína (la flagelina, FliC). Las subunidades de flagelina forman un cilindro hueco concéntrico que consta de 11 protofilamentos, que se disponen paralelos al eje del filamento (Terashima *et al.*, 2008). En el extremo distal del flagelo se encuentra la proteína de recubrimiento o *cap protein*, constituida por cinco monómeros de FliD. El filamento va elongándose mediante el ensamblaje de monómeros de FliC en el extremo distal del flagelo, justo debajo de FliD (Bardy *et al.*, 2003; Erhardt *et al.*, 2010).

3.3.2. Regulación y ensamblaje del aparato flagelar

En la formación del flagelo bacteriano intervienen al menos 50 proteínas, entre proteínas estructurales que forman parte de la estructura definitiva (unas 20) y proteínas accesorias que sólo intervienen durante el ensamblaje (unas 30). El orden de montaje es en su mayor parte lineal y secuencial; es decir, tiene lugar desde las subestructuras más proximales hasta las más distales (Figura 6B). Los componentes integrales de membrana (excluyendo las proteínas Mot), el doble anillo MS y los anillos P y L emplean la ruta Sec para su secreción, pero la mayor parte de las proteínas localizadas por fuera de la membrana citoplasmática utilizan el sistema de secreción tipo III flagelar. Este sistema de secreción exporta ordenadamente las subunidades que componen las distintas estructuras, las cuales viajan a través del canal interior (que a su vez se va construyendo) del cilindro, codo y filamento. Las subunidades se van añadiendo en el extremo distal de la subestructura en formación y su liberación al medio se evita gracias a las proteínas de recubrimiento que se sitúan en dicho extremo distal (p. ej., HAP1 en el codo o FliD en el filamento) (Macnab, 2004; Minamino *et al.*, 2008).

Debido a esta complejidad y a la interacción de diversas partes del flagelo con las envueltas bacterianas, este ensamblaje está muy bien ajustado y la síntesis de los componentes está sometida a un estricto control genético que requiere una regulación temporal y secuencial. La regulación temporal asegura que las proteínas estructurales se producen a medida que se necesitan para el montaje del flagelo naciente (Figura 6) y la expresión secuencial se logra mediante una regulación transcripcional de tipo jerárquico en la que existen puntos de control que permiten coordinar la expresión génica con el ensamblaje del flagelo (Anderson *et al.*, 2010; Macnab, 2003).

Los estudios más detallados sobre la regulación del flagelo se han realizado en *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurim* (Chilcott y Hughes, 2000; Macnab, 2003), *Caulobacter crescentus* (Wu y Newton, 1997), *Vibrio cholerae* (Syed *et al.*, 2009), o *Sinorizobium meliloti* (Sourjik *et al.*, 1998). Aunque existen algunas diferencias respecto a la regulación flagelar entre estos organismos, todos tienen en

común que los genes flagelares se pueden clasificar según los reguladores transcripcionales de los que dependen y el momento de su expresión, por lo que se habla de genes de clase I, clase II, clase III y, en algunos casos, de clase IV (Smith y Hoover, 2009). En la regulación jerárquica, los primeros genes que se expresan codifican proteínas reguladoras que inician la transcripción de genes estructurales tempranos, aquellos que se necesitan en las primeras etapas del ensamblaje del flagelo. A estas proteínas reguladoras se les conoce como reguladores maestros y a los genes que las codifican, genes de clase I. Se han identificado distintos tipos de reguladores maestros y los más estudiados son FlhDC, CtrA, VisNR, FleQ y FlrA (Arora *et al.*, 1997; Klose y Mekalanos, 1998; Kutsukake *et al.*, 1990; Laub *et al.*, 2002; Sourjik *et al.*, 1998). La regulación de la biosíntesis del flagelo está muy bien estudiada en *P. aeruginosa* (Dasgupta *et al.*, 2003), que posee un flagelo polar y cuya biogénesis está regulada en cuatro niveles (Figura 6A).

Genes de clase I

FleQ, el regulador maestro de *P. aeruginosa*, es un activador dependiente de σ^{54} (Arora *et al.*, 1997) que regula directa o indirectamente la expresión de la mayoría de los genes flagelares, a excepción de FliA. *fleQ* y *fliA* se consideran, por tanto, genes de clase I, ya que sus promotores están regulados por factores externos (Figura 6). En *P. aeruginosa* la transcripción de *fleQ* depende del factor σ^{70} y su expresión está modulada por Vfr y AlgT: Vfr es un homólogo de la proteína CRP (*cAMP-receptor protein*) que se une al promotor de *fleQ* impidiendo su expresión (Dasgupta *et al.*, 2002) y AlgT (σ^E) es un factor sigma alternativo que promueve la expresión de AmrZ, un regulador transcripcional que reprime la expresión de *fleQ* (Tart *et al.*, 2005, 2006). Por otra parte, la expresión de *fliA* parece ser constitutiva y no depende de σ^{54} o de otros reguladores flagelares (Dasgupta *et al.*, 2003).

Genes de clase II

La transcripción de los genes de este grupo depende de FleQ y del factor σ^{54} . Los genes de la clase II codifican los componentes estructurales del cuerpo basal: el anillo MS (*fliF*), la proteína chaperona del anillo P (*flgA*), el anillo C (*fliGMN*), parte del eje (*fliE*) y el sistema de secreción tipo III (*fliHIJ*, *fliOPQR*, *flhAB*). También codifican proteínas relacionadas con la elongación del filamento, como la proteína de recubrimiento del filamento (*fliD*), la proteína chaperona de FliC (*fliS*) y FleP, que influye en la estabilidad del filamento flagelar maduro por un mecanismo desconocido (Dasgupta *et al.*, 2003). Asimismo, los genes de clase II codifican proteínas reguladoras, como FleS, FleR, FlhF y FleN. El sistema de dos componentes FleS/FleR es necesario para la activación transcripcional dependiente de σ^{54} de los genes de clase III. FleS es la quinasa sensora que, a diferencia de otras quinazas, es una proteína soluble, no de membrana. FleR es el regulador de respuesta y activador del σ^{54} -holoenzima

(Ritchings *et al.*, 1995). FlhF es responsable de la localización polar del flagelo en *P. aeruginosa* y *P. putida* (Murray y Kazmierczak, 2006; Pandza *et al.*, 2000) y FleN reprime la actividad de FleQ uniéndose a él, controlando así el número de flagelos (Dasgupta *et al.*, 2000; Dasgupta y Ramphal, 2001).

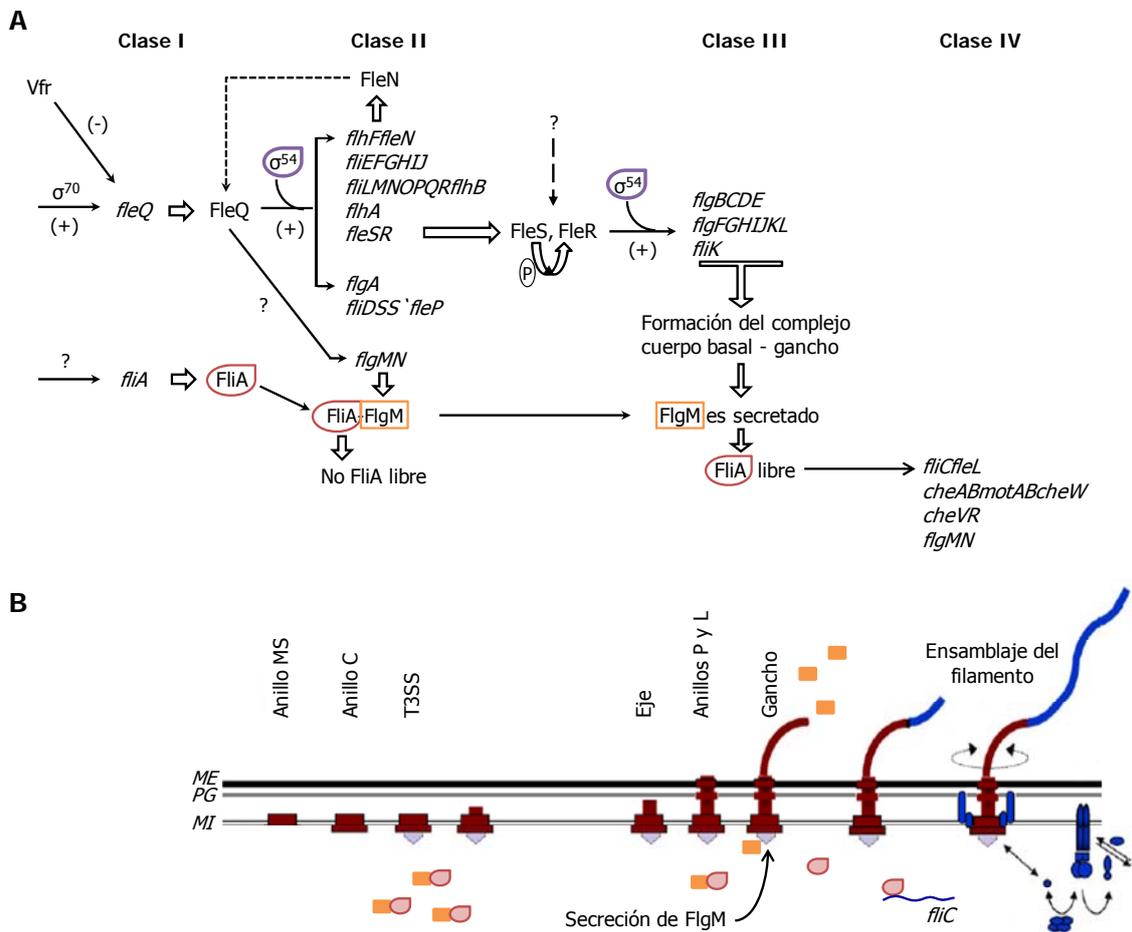


Figura 6. Modelo propuesto de expresión de los genes flagelares y ensamblaje del flagelo en *P. aeruginosa*.

A. Jerarquía transcripcional de expresión de los genes flagelares. El control temporal de los genes flagelares asegura que se expresen solo cuando sus productos sean necesarios para la síntesis del flagelo. (+) y (-) significa regulación positiva y negativa, respectivamente; ?, factor(es) desconocido(s). La fosforilación de FleR por FleS se indica mediante la transferencia del grupo fosfato (P). Modificado de Dasgupta *et al.* (2003).

B. Modelo de ensamblaje del flagelo. Se inicia con la formación del anillo MS del cuerpo basal, seguido por el gancho y finalmente el filamento. El factor anti-sigma FlgM inhibe la actividad de FliA. La formación del complejo cuerpo basal-gancho es un punto de control clave para la coordinación del ensamblaje con la expresión génica, ya que FlgM se exporta fuera de la célula a través de este complejo y el factor sigma FliA libre puede iniciar ahora la transcripción de los genes de clase IV, como *fliC*. ME, membrana externa; PG, peptidoglicano y MI, membrana interna o citoplasmática. Modificado de Apel y Surette (2008).

Genes de clase III

Su expresión depende de RpoN y FleS/FleR y codifican el eje del cuerpo basal (*flgBC*, *flgFG*), los anillos L y P (*flgHI*), la proteína que controla la longitud del gancho (*fliK*), el gancho (*flgDE*, donde FlgE

es la proteína estructural del gancho y FlgD la proteína de recubrimiento del gancho) y las proteínas de unión entre el gancho y el filamento (*flgKL*) (Dasgupta *et al.*, 2003).

Genes de clase IV

La expresión de los genes flagelares tardíos requiere el factor alternativo sigma σ^{28} y el sistema de secreción de proteínas flagelares juega un papel esencial en la regulación de su actividad. Dos de los componentes unidos a membrana, FlhA y FlhB, tienen grandes dominios citoplasmáticos. Cuando el gancho está completo FliK, la proteína que controla su longitud, procesa el dominio citoplasmático de FlhB, lo que provoca un cambio en la especificidad de sustrato del sistema de secreción, que pasa de secretar proteínas del eje y del gancho a presentar mayor afinidad por proteínas del filamento (FliC y FliD) y por FlgM (Apel y Surette, 2008; Ferris y Minamino, 2006; Minamino *et al.*, 2008; Minamino y Macnab, 2000; Moriya *et al.*, 2006). Tanto *fliA* como *flgM* son genes tempranos, pero FlgM inhibe la actividad de FliA hasta que el complejo cuerpo basal/gancho está completo. Entonces se secreta FlgM, FliA queda libre y empieza a transcribir los genes tardíos (Frisk *et al.*, 2002; Jyot *et al.*, 2007). Los genes de clase IV codifican la proteína estructural del filamento (*fliC*) y la proteína responsable de su longitud (*fleL*), el motor flagelar (*motAB*), proteínas de quimiotaxis (*cheAB*, *cheW* y *cheVR*) y proteínas reguladoras como FlgN, chaperona de las proteínas FlgK y FlgL asociadas al gancho (Aldridge *et al.*, 2003; Dasgupta *et al.*, 2003; Fraser *et al.*, 1999).

El modelo propuesto para el ensamblaje del único flagelo polar en *P. aeruginosa* está basado en el conocimiento actual de la regulación transcripcional y post-traducciona de los diferentes genes flagelares (Figura 6B). Tras activar FleQ la expresión de los genes de clase II, FlhF probablemente determina el lugar de inserción del nuevo flagelo. Los productos de los otros genes de clase II, que forman el anillo MS, el estator, la región proximal del eje y el sistema de secreción flagelar se ensamblan posteriormente en el flagelo naciente. También se expresa FliD (proteína de recubrimiento del filamento), que no se acoplará en el flagelo hasta que el gancho y las proteínas de unión del gancho al filamento, codificadas por genes de clase III, se incorporen a la estructura. Asimismo, la síntesis simultánea de FleN a partir de otro gen de clase II, contribuye a mantener el estado monoflagelar al inhibir la actividad de FleQ y, por consiguiente, la síntesis posterior de la mayoría de los componentes estructurales. El sistema de dos componentes FleS/FleR activa los genes de clase III, que codifican las proteínas necesarias para terminar la estructura del cuerpo basal y del gancho. Los componentes del eje son secretados por el T3SS y progresivamente ensamblados, para que los anillos P y L (exportados por la vía Sec) se acoplen en la membrana externa. Cuando esto ocurre, se construye el gancho de manera controlada por FliK. Los últimos pasos del ensamblaje incluyen la

secreción del conjunto de proteínas asociadas al gancho (FlgK, FlgL), de FliD y del factor antisigma FlgM. Esto último permite la transcripción de los genes dependientes de FliA, que codifican la flagelina (FliC), la proteína que controla su longitud (FleL) y algunas proteínas de quimiotaxis. El ensamblaje de la flagelina se produce en la parte distal del filamento creciente, bajo la proteína de recubrimiento FliD (revisado en Dasgupta *et al.*, 2003; Erhardt *et al.*, 2010).

3.4. Regulación global. El sistema de dos componentes GacS/GacA

Los sistemas de dos componentes, ampliamente distribuidos en bacterias, perciben y/o reconocen señales ambientales y transmiten esa información a factores de transcripción que, a su vez, activan la expresión de uno o varios genes, permitiendo a la bacteria adaptarse rápidamente en respuesta a las diferentes condiciones ambientales. Los sistemas de dos componentes generalmente comprenden dos proteínas: una histidina quinasa sensora (HK, *histidine kinase*), que percibe la señal, y un regulador de respuesta (RR, *response regulator*). Tras la detección de la(s) señal(es), la proteína sensora se autofosforila y activa al regulador de respuesta por fosfotransferencia, que funciona entonces como regulador transcripcional de uno o más genes (Heeb y Haas, 2001).

El sistema de dos componentes GacS/GacA (*Gac*, *global activation*) fue descrito por primera vez en dos cepas colonizadoras de plantas. La HK GacS, inicialmente llamada LemA (*lesion manifestation*), se describió en *P. syringae* pv. *syringae* B728a como un factor esencial para la producción de lesiones en hojas de judía, ya que la inactivación de *gacS* provocaba en esta cepa una disminución en la supervivencia y una pérdida de la virulencia (Hrabak y Willis, 1992). El RR GacA se describió por primera vez en *P. fluorescens* CHA0 como un activador global de la producción de antibióticos y cianuro. En esta cepa la pérdida de *gacA* disminuyó su capacidad de adaptación y su actividad antifúngica (Laville *et al.*, 1992). Posteriormente, este sistema de dos componentes se ha encontrado en otras bacterias Gram-negativas y se ha demostrado que controla una gran variedad de fenotipos: patogenicidad, capacidad promotora del crecimiento vegetal, supervivencia, motilidad, formación de biopelículas o producción de metabolitos secundarios, como antibióticos, señales de *quorum sensing*, toxinas, polisacáridos extracelulares, proteínas secretadas, sideróforos y enzimas extracelulares (revisado en Heeb y Haas, 2001; Lapouge *et al.*, 2008; Sonnleitner y Haas, 2011). En *P. syringae* el sistema de dos componentes GacS/GacA es el regulador maestro del metabolismo secundario (Chatterjee *et al.*, 2003; Lapouge *et al.*, 2008) y varios estudios han demostrado que importantes procesos bacterianos dependen de este sistema en diferentes patovares de *P. syringae* (Tabla 1).

Tabla 1. Fenotipos controlados por el sistema de dos componentes GacS/GacA en *P. syringae*. Adaptada de Heeb y Hass (2001).

<i>P. syringae</i>	GacS/GacA regulan positivamente la producción de	Efecto de la mutación en gacS o gacA	Referencia
cepa BR2R	Proteasas extracelulares Tabtoxina	Reducción de síntomas en hojas de judía	Barta <i>et al.</i> , 1992, 1993
pv. coronafaciens Pc27R	Proteasas extracelulares Tabtoxina	Ausencia de clorosis en hojas de avena	Barta <i>et al.</i> , 1992, 1993
pv. phaseolicola NPS3121	Faseolotoxina	No tiene efecto sobre los síntomas en hojas de judía	De la Torre-Zavala <i>et al.</i> , 2011 Rich <i>et al.</i> , 1992
pv. syringae B301D	Siringomicina Siringopeptina Siringolina ^a	Afecta transcripción de <i>SalA^c</i>	Kitten <i>et al.</i> , 1998; Wang <i>et al.</i> , 2006 Wäspi <i>et al.</i> , 1998
pv. syringae B728a	Siringomicina Proteasas extracelulares Siringolina AHLs ^b Alginato Tabtoxina	Afecta transcripción de <i>salA^c</i> No motilidad <i>swarming</i> Reducción de síntomas en hojas de judía No afecta HR Reducción de adaptabilidad	Hrabak y Willis, 1992, 1993; Rich <i>et al.</i> , 1994; Kitten <i>et al.</i> , 1998; Wäspi <i>et al.</i> , 1998 Kinscherf y Willis, 1999; Willis <i>et al.</i> , 2001; Quiñones <i>et al.</i> , 2005; Willis <i>et al.</i> , 1990; Hirano <i>et al.</i> , 1997
pv. tabaci 6605	AHLs ^b Alginato Pigmentos	No motilidad <i>swarming</i> pero si <i>swimming</i> No producción de pigmentos Disminución de adhesión Disminución expresión de genes <i>hrp</i> Disminución de síntomas en tabaco No afecta HR	Marutani <i>et al.</i> , 2008
pv. tomato DC3000	Pigmentos AHLs ^b Coronatina Factores sigma HrpL, RpoN y RpoS	No producción de pigmentos No motilidad <i>swarming</i> Afecta transcripción de <i>salA^c</i> Disminución de síntomas en hojas de tomate y <i>A. thaliana</i> Afecta HR	Chatterjee <i>et al.</i> , 2003

^a, péptido que estimula la resistencia adquirida en arroz contra *Pyricularia oryzae*; ^b, N-acil-homoserina lactonas; ^c, *salA* (*syringomycin and lesion formation*) proteína reguladora de la producción de toxinas.

Inicialmente se creía que el sistema de dos componentes GacS/GacA actuaba directamente sobre la transcripción de los genes que regula; sin embargo, actualmente se sabe que actúa en conjunto con la red de regulación del metabolismo secundario Rsm (*regulator of secondary metabolism*). La cascada de transducción de señal en la que interviene el sistema GacS/GacA está muy bien estudiada en *P. fluorescens* CHA0 y se inicia con la recepción de la(s) señal(es), hasta ahora desconocida(s), por la proteína sensora GacS en la membrana, tras lo que se fosforila a sí misma y a la proteína RR GacA, localizada en el interior de la célula (Figura 7). GacA fosforilada es activa y se une a una secuencia conservada denominada caja Gac (cuyo consenso es TGTAAGN₆CTTACA) situada aguas arriba de los promotores de unos ARNs reguladores de pequeño tamaño: *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ* (Heeb *et al.*, 2002; Humair *et al.*, 2010; Kay *et al.*, 2005; Kulkarni *et al.*, 2006; Valverde *et al.*, 2003). Estos ARNs de pequeño tamaño se unen con alta afinidad a dos proteínas represoras, RsmA y RsmE. En condiciones normales, estas proteínas Rsm se encuentran unidas a determinados ARNm implicados en la síntesis de compuestos del metabolismo secundario de la bacteria, bloqueando su secuencia Shine-Dalgarno (SD) con lo que inhiben su traducción y/o afectan a su estabilidad (Schubert *et al.*, 2007). En presencia de los ARNs reguladores de pequeño tamaño, las proteínas represoras se unen a ellos, liberando los ARNm, lo que permite su traducción (Blumer *et al.*, 1999; Reimmann *et al.*, 2005).

En algunas especies bacterianas la actividad del sistema GacS/GacA está modulada por otras proteínas reguladoras. Así, en *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* dos proteínas histidina quinasa sensoras, RetS y LadS, tienen un efecto negativo y positivo respectivamente, sobre GacS (Figura 7). RetS (*regulator of exopolysaccharides and T3SS*) forma heterodímeros con GacS provocando su inhibición (Goodman *et al.*, 2004, 2009), mientras que LadS (*lost adherence phenotype*) mantiene la actividad de GacS, probablemente a través de una interacción proteína-proteína (Ventre *et al.*, 2006; Workentine *et al.*, 2009). En conjunto, RetS, GacS y LadS, determinan la activación o no de GacA y por tanto, de la cascada Gac/Rsm.

En *P. aeruginosa* se ha descrito que el sistema de dos componentes GacS/GacA afecta a la motilidad, ya que mutantes en *gacA* presentan una mayor motilidad tipo *swarming*, un aumento en la expresión de flagelina (FliC) y de la proteína de recubrimiento del filamento (FliD) (Kay *et al.*, 2006). Por el contrario, un mutante *rsmA* no hace *swarming* y presenta una motilidad tipo *swimming* reducida (Burrowes *et al.*, 2006; Heurlier *et al.*, 2004), indicando que este sistema regula los dos tipos de motilidad. En la cepa *P. fluorescens* F113, los mutantes *gacS* y *gacA* muestran una mayor motilidad tipo *swimming*. La regulación negativa por parte de GacS/GacA se produce a través de las proteínas RsmA y RsmE, que se unen al ARNm que codifica *algU*, el factor sigma necesario para la expresión de *amrZ*. En *P. fluorescens* F113, AmrZ es el represor transcripcional de *fleQ*, el regulador maestro de la

biosíntesis de flagelo (Martínez-Granero *et al.*, 2012; Navazo *et al.*, 2009). Sin embargo, en *P. syringae* ocurre lo mismo que en *P. aeruginosa*: las mutaciones en el sistema de dos componentes GacS/GacA provocan una disminución de la motilidad tipo *swarming* (Chatterjee *et al.*, 2003; Kinscherf y Willis, 1999). Aunque la cascada de regulación mediada por Gac/Rsm en *P. syringae* no ha sido caracterizada, Chatterjee *et al.* (2003) demostraron que GacA controla la transcripción de dos ARNs de pequeño tamaño, *rsmZ* y *rsmB*. Recientemente, en Pto DC3000 se ha demostrado la existencia, pero no la funcionalidad, de siete ARNs de pequeño tamaño controlados por GacA (*rsmX1-5*, *rsmY* y *rsmZ*) y de cuatro proteínas de unión a ARN tipo RsmA (Heeb *et al.*, 2006; Kulkarni *et al.*, 2006; Lapouge *et al.*, 2008; Moll *et al.*, 2010).

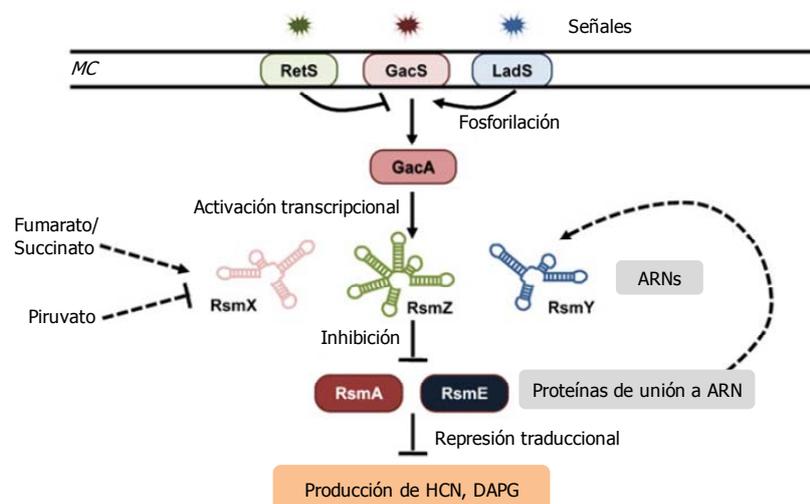


Figura 7. Modelo de la ruta de transducción de señal Gac/Rsm en *P. fluorescens* CHA0.

El sistema de fosforilación compuesto por las quinazas sensoras GacS, RetS y LadS controla la actividad de GacA. GacA fosforilada activa la transcripción de unos ARNs reguladores de pequeño tamaño, *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ* que “secuestran” las proteínas represoras RsmA y RsmE, inhibiendo su función. La punta de flecha, indica control positivo; la línea perpendicular, control negativo; y la línea entrecortada, control indirecto. HCN, ácido cianhídrico; DAPG, 2,4-diacetilfloroglucinol; MC, membrana citoplasmática. Modificado de Sonnleitner y Haas (2011).

4. Resistencia a compuestos antimicrobianos mediada por transportadores

Los microorganismos están expuestos a agentes químicos deletéreos presentes en el medio ambiente de forma natural, como antibióticos sintetizados por comunidades microbianas, detergentes procedentes de las sales biliares producidas en el tracto intestinal de animales superiores, o compuestos tóxicos sintetizados por las plantas frente al ataque de patógenos (Bednarek y Osbourn, 2009; Dixon, 2001; Piddock, 2006). Además, como consecuencia de la actividad industrial, agrícola y urbana, los microorganismos están expuestos a compuestos químicos nocivos, tanto orgánicos como inorgánicos, biogénicos y xenobióticos. Asimismo, los avances en el tratamiento de agentes infecciosos

han facilitado el desarrollo de productos con actividad antimicrobiana, como antibióticos semisintéticos o biocidas (Levy y Marshall, 2004; Russell, 2000). Todos estos compuestos antimicrobianos actúan sobre la pared celular, la membrana citoplasmática o sobre rutas biosintéticas esenciales para el crecimiento bacteriano; sin embargo, existen bacterias resistentes a la acción de estos compuestos porque han desarrollado mecanismos protectores. Uno de los métodos más extendidos de resistencia microbiana es la eliminación de compuestos tóxicos de la célula mediante transportadores de amplio espectro en un proceso dependiente de energía (Nikaido, 2001; Ramos *et al.*, 2002). Estos transportadores pueden ser específicos para un sustrato o pueden transportar una gama de compuestos estructuralmente diferentes, incluyendo antibióticos, biocidas, colorantes, detergentes, inhibidores metabólicos, disolventes orgánicos e incluso moléculas producidas por el organismo hospedador (revisado en Li y Nikaido, 2009). Los transportadores que expulsan varios compuestos están asociados a la multiresistencia (MDR, *multidrug resistance*) y tienen una gran importancia clínica, ya que provocan infecciones bacterianas intratables.

Los transportadores bacterianos de tipo MDR se clasifican en varias familias según su modo de acción y los sustratos que exportan (Figura 8): la superfamilia ABC (*ATP-binding cassette*), (van Veen *et al.*, 2001), la superfamilia MFS (*major facilitator superfamily*), (Pao *et al.*, 1998), la familia MATE (*multidrug and toxic compounds extrusion*), (Omote *et al.*, 2006), la familia SMR (*small multidrug resistance*), (Paulsen *et al.*, 1996) y la superfamilia RND (*resistance, nodulation, cell division*), (Tseng *et al.*, 1999).

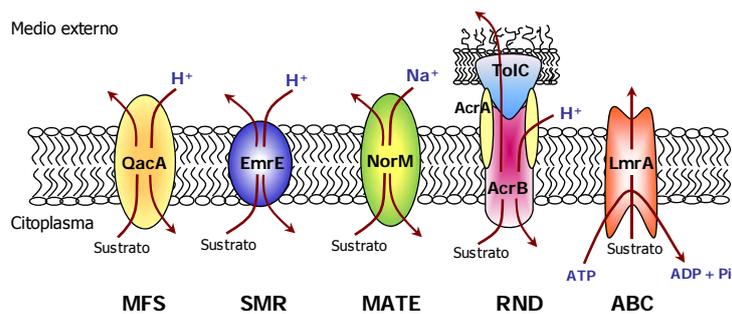


Figura 8. Representación esquemática de los cinco tipos de transportadores MDR caracterizados en bacterias.

Se muestra un ejemplo de cada familia de transportadores: QacA de *Staphylococcus aureus*, de la familia MFS; EmrE de *E. coli*, de los transportadores SMR; NorM de *Vibrio parahaemolyticus*, de la familia MATE; AcrA-TolC de *E. coli*, miembro de la familia RND y LmrA de *Lactococcus lactis* de la familia ABC. Modificado de Paulsen (2003).

4.1. Transportadores RND

En bacterias Gram-negativas, los miembros de la familia RND son los más relevantes desde el punto de vista clínico (Poole, 2003; Saier *et al.*, 2006; Transporter Classification Database <http://www.tcdb.org/tcdb/index.php?tc=2.A.6>). Se organizan como sistemas tripartitos (Figura 9): el transportador RND, localizado en la membrana citoplasmática y que actúa como una bomba de extrusión dependiente de energía, funciona conjuntamente con una proteína de la membrana externa (OMF, *outer membrane factor*) que se expande en el periplasma y forma un canal continuo, evitando que el compuesto tóxico se acumule transitoriamente en el periplasma. Además, una proteína de fusión periplásmica (MFP, *membrane fusion protein*) facilita la formación del canal y la eliminación de los compuestos tóxicos del periplasma o de la cara externa de la membrana interna (Eswaran *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2006).

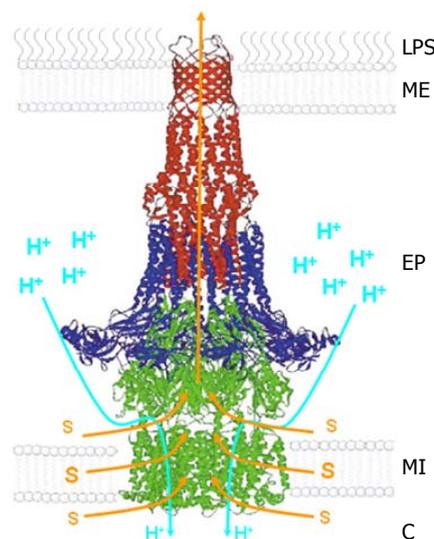


Figura 9. Modelo de organización estructural de los componentes de un transportador tripartito de la familia RND.

Eswaran *et al.* (2004) propusieron que el componente transportador de membrana interna (verde) se organiza como un trímero que atraviesa la membrana interna (MI) y se expande dentro del espacio periplásmico (EP) hasta contactar con la porina de membrana externa (OMF, en rojo), que también es trimérica y forma un cilindro desde la membrana externa que se expande hacia el espacio periplásmico. El tercer componente, la proteína de fusión de membrana (MFP, en azul) formaría un anillo que se encargaría de estabilizar el acoplamiento de los otros dos componentes. Debido a que el transportador posee una amplia cámara interna con aperturas al citosol, a la membrana interna y al periplasma, se proponen varias vías para la expulsión del sustrato al medio extracelular, pudiendo ser translocado desde cualquiera de estas tres (Elkins y Nikaido, 2003; Murakami y Yamaguchi, 2003). La energía necesaria proviene del gradiente de protones y se lleva a cabo por un mecanismo de antiporte sustrato/H⁺. El tamaño de los símbolos H⁺ y S reflejan la concentración de protones y sustrato en cada compartimento celular. C, citosol; LPS, lipopolisacárido.

Los transportadores de la familia RND están ampliamente distribuidos en bacterias Gram-negativas oportunistas y patógenas de animales y humanos, patógenas y simbioses de plantas y

bacterias del suelo inocuas (revisado en Nikaido, 2009). Expulsan un amplio rango de sustratos, entre los que se encuentran antibióticos lipofílicos y anfifílicos, agentes quimioterapéuticos, inhibidores metabólicos, colorantes, detergentes, biocidas, hidrocarburos aromáticos, ácidos grasos tóxicos, sales biliares e incluso homoserin lactonas asociadas con *quorum sensing*. Aunque en un principio estos transportadores se estudiaron porque exportaban antibióticos, se ha demostrado que eliminan también agentes antimicrobianos producidos por el hospedador. En algunas cepas incluso exportan determinantes de virulencia, como adhesinas, toxinas u otras proteínas importantes para la colonización y la infección de células humanas y animales (Pidcock, 2006; Poole, 2004). Estos hallazgos han llevado a pensar que el papel fisiológico de estos transportadores es permitir la supervivencia de la bacteria que los porta en su nicho ecológico (Martínez *et al.*, 2009).

4.2. Regulación de la expresión de transportadores MDR bacterianos

La expresión desmesurada de proteínas integrales de membrana que utilizan la fuerza protón motriz tiene efectos perjudiciales para la célula; por esta razón, la expresión de los genes implicados en MDR está controlada a nivel transcripcional y/o traduccional, manteniendo unos niveles bajos del transportador (Alonso *et al.*, 2004; Hillen y Berens, 1994; Johanesen *et al.*, 2001; Lee y Edlin, 1985; Ma *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 1989). De hecho, la expresión de la mayoría de genes que codifican transportadores de este tipo está controlada por reguladores transcripcionales (la mayoría represores, aunque a veces activadores) cuyos genes se sitúan adyacentes al gen (o genes) del transportador MDR. Pero además de esta regulación específica o local, en algunos casos existe un control adicional por reguladores globales (Grkovic *et al.*, 2001b; Li y Nikaido, 2009).

La amplia especificidad de sustrato exhibida por los transportadores MDR contrasta con la limitada especificidad química que muestran la mayoría de proteínas de unión a ligando. Sin embargo, la capacidad de reconocer múltiples compuestos no es exclusiva de los transportadores, sino que también la presentan varios reguladores transcripcionales que controlan la expresión de esos transportadores; es decir, los reguladores responden a los mismos compuestos que expulsa el transportador (Alguel *et al.*, 2007; Grkovic *et al.*, 1998; Lomovskaya *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1996; Terán *et al.*, 2003, 2006). Hasta la fecha, los reguladores estudiados que modulan sistemas MDR pertenecen a las familias de TetR, MarR, IclR, LysR y LacI/GalR.

TetR de *E. coli* y QacR de *S. aureus* son las proteínas pertenecientes a la familia de reguladores transcripcionales de TetR mejor caracterizadas (Aramaki *et al.*, 1995; Poole, 2007; Ramos *et al.*, 2005). Ambos represores se unen a operadores localizados entre las regiones -10 y -35 de los promotores que regulan, impidiendo, por tanto, su expresión. La inducción tiene lugar cuando, tras la unión del efector

(tetraciclina-Mg²⁺ para TetR, o colorantes, biguanidas y compuestos de amonio cuaternario para QacR), se produce un cambio conformacional en el represor que provoca su disociación del operador, permitiendo entonces el acceso de la ARN-polimerasa al mismo y su transcripción. A pesar de las similitudes en el mecanismo, existen diferencias entre ambos reguladores, tanto en su unión al operador como en el reconocimiento de los efectores. En el caso de QacR son necesarios dos dímeros unidos de forma cooperativa y solapante a una secuencia palindrómica de 28 pb para reprimir la transcripción de *qacA*, mientras que TetR se une como un único dímero a un operador de 18 pb. Asimismo y a diferencia de TetR, la represión mediada por QacR no es total, por lo que existe una cierta expresión basal de *qacA*, y QacR no regula la expresión de su propio gen, como ocurre en el caso de TetR (Grkovic *et al.*, 1998, 2001a). Otra diferencia radica en la capacidad de QacR para unirse a múltiples agentes antimicrobianos con distintas estructuras químicas con una estequiometría de unión 1:2, es decir, de una molécula de efector por dímero de proteína. Entre los efectores de QacR se encuentran cationes hidrofóbicos sintéticos (gluconato de clorhexidina, cloruro de decualinio y de cetilpiridinio, rodamina, cristal violeta, etc.) o naturales (berberina), todos sustratos del transportador QacA (Murray *et al.*, 2004; Schumacher *et al.*, 2001). En el caso de TetR, la alta afinidad por su ligando específico, tetraciclina-Mg²⁺, es una particularidad de este sistema que induce la expresión del transportador TetA (Scholz *et al.*, 2003).

4.3. Transportadores RND en bacterias fitopatógenas

Entre los metabolitos secundarios sintetizados por las plantas superiores, los flavonoides, isoprenoides y alcaloides son los principales implicados en la protección frente a patógenos. Estos compuestos participan en una amplia gama de procesos fisiológicos, por lo que pueden estar presentes en el tejido sano de la planta o pueden ser sintetizados *de novo* en respuesta al ataque de patógenos (Dixon, 2001; Osbourn, 1996; Treutter, 2005). Las estrategias desarrolladas por los patógenos para combatir el efecto tóxico de estos compuestos incluyen su inactivación enzimática, la modificación de sus grupos funcionales, la reducción de su absorción y el empleo de transportadores MDR (VanEtten *et al.*, 2001; Walsh, 2000).

Las bacterias fitopatógenas poseen transportadores MDR similares a los presentes en bacterias que infectan a humanos y a animales, algunos de los cuales confieren resistencia a compuestos tóxicos producidos por la planta, lo que favorece la invasión del huésped y el desarrollo de la enfermedad (Piddock, 2006; VanEtten *et al.*, 2001). Asimismo, se ha descrito que la actividad antimicrobiana de algunos compuestos vegetales se debe a su capacidad para inhibir transportadores

MDR (Pagès *et al.*, 2005; Stavri *et al.*, 2007; Tegos *et al.*, 2002), lo que apoya la hipótesis de que la multirresistencia tiene un papel importante en la patogénesis bacteriana.

En el momento de iniciar esta tesis doctoral, los datos existentes sobre la implicación de transportadores MDR del complejo *P. syringae* en la virulencia o supervivencia epifítica eran prácticamente inexistentes, sin embargo, se habían descrito algunos transportadores en otras bacterias fitopatógenas. Por ejemplo, se había demostrado que el transportador lfeAB de *Agrobacterium tumefaciens* está implicado en la colonización competitiva de las raíces de alfalfa al impedir la acumulación intracelular de isoflavonoides (Palumbo *et al.*, 1998). En *Dickeya dadantii* (antes *Erwinia chrysanthemi*) los sistemas AcrAB y EmrAB están implicados en virulencia y colonización epifítica y se han relacionado con la resistencia a péptidos antimicrobianos y a ácidos orgánicos libres, respectivamente (Maggiorani-Valecillos *et al.*, 2006). También en *D. dadantii*, se ha demostrado que la inactivación de TolC tiene un gran efecto en patogénesis (Barabote *et al.*, 2003). TolC es el componente de membrana externa de varias bombas de eflujo de tipo RND, por lo que es probable que esta mutación afecte a la función de un gran número de transportadores a la vez. Asimismo, en *Erwinia amylovora*, que causa el fuego bacteriano en manzano y peral, se demostró que el transportador AcrAB está implicado en supervivencia, colonización de los tejidos vegetales y virulencia en plántulas de manzana debido a que tiene un importante papel en la resistencia a compuestos antibacterianos vegetales, tales como flavonoides, isoprenoides y alcaloides (Burse *et al.*, 2004a). Por otra parte, dos transportadores pertenecientes a la familia RND han sido implicados en la secreción de fitotoxinas: el sistema ToxGHI de *Burkholderia glumae* BGR1 es el encargado de exportar la toxoflavina (Kim *et al.*, 2004) y PseABC de *P. syringae* pv. *syringae*, codificado dentro de la isla de patogenicidad *syr-syp* para la síntesis de siringomicina y siringopeptina, es el responsable de la secreción de esas fitotoxinas (Kang y Gross, 2005).

5. *P. syringae* pv. *tomato*

P. syringae pv. *tomato* (Pto) es el agente causante de la mancha negra del tomate, una enfermedad ampliamente distribuida y de gran importancia económica que se manifiesta con lesiones de color marrón oscuro a negro de diferentes tamaños y formas en las hojas, frutos y tallos, pudiendo estar rodeadas por un halo amarillo (Figura 10). Las lesiones con frecuencia se concentran en los bordes de las hojas, provocando una extensa necrosis marginal. En el fruto, las lesiones generalmente son pequeñas, con forma de lunar y superficiales, sin embargo, también pueden alcanzar los 3 mm de diámetro y ser más profundas, y en frutos inmaduros están rodeadas por un halo verde. El desarrollo

de esta enfermedad en la planta puede generar un amarilleamiento generalizado, seguido de desecación y, en casos severos, las plantas infectadas presentan retraso en la madurez del fruto y reducen su producción. Las bacterias pueden sobrevivir en el suelo, en restos de plantas enfermas y en semillas. El patógeno se propaga por salpicaduras de lluvia o de riego por aspersión. La infección en las plantas susceptibles se ve favorecida por el clima fresco y húmedo, mientras que el progreso de la enfermedad se detiene en ambientes calurosos (Hirano y Upper, 2000; Preston, 2000).

P. syringae pv. tomato DC3000 (Pto DC3000) es una cepa resistente a rifampicina derivada de *P. syringae* pv. tomato NCPPB1106. Ha sido ampliamente utilizada para el estudio de los factores de virulencia de la bacteria y los mecanismos moleculares de la respuesta del hospedador frente a la infección, no sólo por la importancia de la enfermedad en tomate y crucíferas, sino también porque la cepa Pto DC3000 es patógeno de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (Cuppels, 1986; Cuppels y Ainsworth, 1995). Además, provoca una respuesta hipersensible (HR) en plantas no hospedadoras como tabaco (*Nicotiana tabacum*), *Nicotiana benthamiana* y judía (*Phaseolus vulgaris*) (Fouts *et al.*, 2003; Preston, 2000; Rodríguez-Moreno *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que en ausencia del efector HopQ1-1, DC3000 causa enfermedad en la planta modelo *N. benthamiana* y la severidad de la lesión es similar a la observada en tomate y *A. thaliana* (Wei *et al.*, 2007).

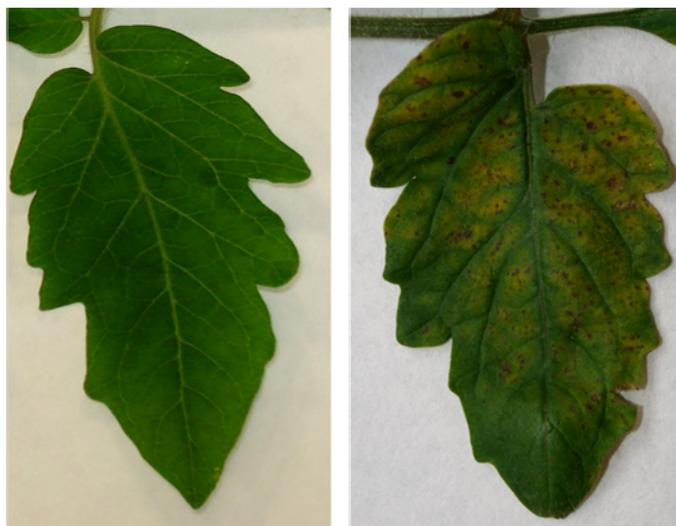


Figura 10. Sintomatología causada por *P. syringae* pv. tomato DC3000 en hojas de tomate.
Fotografías de hojas de plantas de tomate sin infectar (izquierda) e infectadas (derecha) con Pto DC3000.
Se observan los síntomas característicos: puntos necróticos rodeados por halos cloróticos.

El genoma de Pto DC3000 se compone de un cromosoma circular de 6.397.126 pb y dos plásmidos: pDC3000A (73.661 pb) y pDC3000B (67.473 pb), que en conjunto portan alrededor de 5.800 genes. El análisis comparativo de su genoma con el de otras especies de *Pseudomonas*, ha permitido establecer que DC3000 tiene rutas metabólicas clave como glucólisis, gluconeogénesis, ruta

de las pentosas fosfato y ciclo de Krebs, pero es incapaz de convertir el piruvato en lactato ya que carece de la enzima lactato deshidrogenasa (Buell *et al.*, 2003). Además, Pto DC3000 posee un amplio repertorio de transportadores para la adquisición de nutrientes, especialmente azúcares, y un número limitado de transportadores para aminoácidos en comparación con *P. putida* y *P. aeruginosa*. Como bacteria asociada a plantas, DC3000 puede establecerse como epífita o como patógeno, de ahí que aproximadamente el 12% de sus genes está asociado con regulación génica, transducción de señales y transcripción, lo que le permite responder a diversas condiciones ambientales (Bender *et al.*, 1999; Buell *et al.*, 2003; Chatterjee *et al.*, 2003; Hutcheson *et al.*, 2001; Ullrich *et al.*, 1995). El genoma de DC3000 codifica también un gran número de proteínas implicadas directa o indirectamente en virulencia, como aquellas relacionadas con motilidad, adhesión, sistema de secreción tipo III, producción de toxinas, bloqueo de la respuesta inmune de la planta hospedera, sistemas de captación de hierro o enzimas extracelulares, entre otras.

En *P. syringae* pv. tomato DC3000, el T3SS y la síntesis de coronatina son los principales factores de virulencia. En el genoma de DC3000 alrededor de 40 genes, entre efectores y proteínas accesorias secretadas por el T3SS, tienen un papel en la translocación de proteínas a las células vegetales (Alfano y Collmer, 2004; Lindeberg *et al.*, 2006; Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002). Curiosamente, algunos de ellos están en el plásmido pDC3000A, pero aún no se ha establecido el papel de los mismos en la virulencia de Pto, debido probablemente a que algunos de los efectores codificados en pDC3000A tienen parálogos en el cromosoma (Buell *et al.*, 2003).

En DC3000 los genes implicados en la síntesis de coronatina están codificados en el cromosoma y los genes para la síntesis de los ácidos coronafácico y coronámico (componentes de la coronatina) están separados 26 kb, a diferencia de lo que ocurre en otros patovares de *P. syringae* en los que los genes para la síntesis de coronatina están agrupados y codificados en plásmidos (Brooks *et al.*, 2004). La expresión de los genes para la síntesis de la coronatina de DC3000, como en otras *P. syringae*, es dependiente del factor sigma alternativo HrpL, necesario también para la transcripción de los genes *hrp* (Cuppels y Ainsworth, 1995; Fouts *et al.*, 2002). Aunque en el genoma de DC3000 no se han identificado genes para la síntesis de otras fitotoxinas como siringomicina, siringotoxina y siringopeptina, se han encontrado 5 genes que codifican para péptido sintetasa. Una de ellas ha sido caracterizada y sintetiza 6 lipopéptidos involucrados en la motilidad tipo *swarming* (Berti *et al.*, 2007; Buell *et al.*, 2003). Adicionalmente, ciertos patovares de *P. syringae* producen la fitohormona ácido indolacético (IAA, *indole-3-acetic acid*), que influye en el crecimiento bacteriano *in planta* y causa tumores (Glickmann *et al.*, 1998; Mazzola y White, 1994). En el genoma de DC3000 se ha identificado

el gen *iaaL*, que convierte el IAA en el conjugado IAA-lisina y en su región promotora se encuentra la caja *hrp*, lo que sugiere un papel en virulencia (Fouts *et al.*, 2002).

Otros genes identificados en el genoma de Pto DC3000 importantes para el crecimiento epifítico y colonización son los relacionados con la adhesión a superficies, como los de los pili tipo IV y la producción de exopolisacáridos (Keith *et al.*, 2003; Roine *et al.*, 1998). Asimismo, hay genes que codifican para posibles enzimas degradadoras de pared celular: pectina liasa, poligalacturonasa y otras con posible actividad celulolítica. Cabe destacar que DC3000 carece del gen que codifica para la proteína nucleadora de hielo (*InaZ*, *ice nucleation activity*), responsable de los daños por heladas en plantas infectadas y que sí se encuentra presente en otras cepas del complejo *P. syringae* (Buell *et al.*, 2003; Lindow *et al.*, 1989).

En el genoma de Pto DC3000 se encuentran anotados 12 transportadores de tipo RND, incluyendo los probables ortólogos de los sistemas Mex de *P. aeruginosa* y de otros sistemas descritos hasta el momento (Buell *et al.*, 2003; Ren *et al.*, 2004; <http://www.membranetransport.org>). El transportador MexAB-OprM es uno de los sistemas RND de Pto DC3000 codificado por un operón putativo que comprende los marcos abiertos de lectura PSPTO_4303, PSPTO_4304 y PSPTO_4305. El análisis comparativo del sistema MexAB-OprM de Pto DC3000 con otros transportadores tipo RND disponibles en las bases de datos del NCBI y KEGG permitió establecer que este transportador era un 96-97% idéntico en secuencia de aminoácidos al de otras cepas del complejo *P. syringae* (pv. tomato, *syringae* y *phaseolicola*) (Tabla 2). Se encuentran ortólogos de este transportador en varias cepas de *P. putida*: TtgABC de *P. putida* DOT-T1E y KT2440, que expulsa tanto disolventes orgánicos como diferentes antibióticos (Nelson *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 1998); MepABC de *P. putida* KT2442, que mejora la tolerancia de esta cepa a disolventes orgánicos como tolueno y xileno (Fukumori *et al.*, 1998); ArpABC de *P. putida* S12, que confiere resistencia múltiple a antibióticos (Kieboom y de Bont, 2001). Otros transportadores que presentan menor identidad son SrpABC de *P. putida* S12, que presenta un 61% de identidad y está implicado la expulsión de disolventes orgánicos; AcrAB de *E. amylovora* que confiere resistencia a compuestos antibacterianos de origen vegetal, con un 66% de identidad. Por otra parte, uno de los sistemas mejor caracterizados, MexAB-OprM de *P. aeruginosa* que confiere resistencia a múltiples antibióticos (Poole, 2001; Poole *et al.*, 1993), se incluye dentro de los transportadores de *Pseudomonas* con menor homología.

Tabla 2. Proteínas homólogas a los componentes de la bomba MexAB-OprM de Pto DC3000

Organismo	MFP	Transportador	OMF	Referencia
<i>P. syringae</i>				
pv. <i>tomato</i> DC3000	PSPTO_4303 MexA	PSPTO_4304 MexB	PSPTO_4305 OprM	Buell <i>et al.</i> , 2003
pv. <i>syringae</i> B728a	PSYR_4007 (96%)	PSYR_4008 (97%)	PSYR_4009 (95%)	Feil <i>et al.</i> , 2005
pv. <i>phaseolicola</i> 1448	PSPPH_4013 (96%)	PSPPH_4014 (96%)	PSPPH_4015 (96%)	Joardar <i>et al.</i> , 2005
<i>P. putida</i>				
DOT-T1E	TtgA (70%)	TtgB (82%)	TtgC (79%)	Ramos <i>et al.</i> , 1998
KT2440	TtgA (70%)	TtgB (82%)	TtgC (79%)	Nelson <i>et al.</i> , 2002
KT2442	MepA (70%)	MepB (82%)	MepC (79%)	Fukumori <i>et al.</i> , 1998
S12	ArpA (72%)	ArpB (82%)	ArpC (79%)	Kieboom y de Bont, 2001
S12	SrpA (57%)	SrpB (61%)	SrpC (56%)	Kieboom <i>et al.</i> , 1998
<i>P. aeruginosa</i>	MexA (65%)	MexB (79%)	OprM (68%)	Poole <i>et al.</i> , 1993
<i>E. amylovora</i>	AcrA (53%)	AcrB (66%)	-	Burse <i>et al.</i> , 2004
<i>E. coli</i>	AcrA (55%)	AcrB (65%)	-	Ma <i>et al.</i> , 1993

MFP (*m*embrane *f*usion *p*rotein), proteína de fusión periplásmica; OMF (*o*uter *m*embrane *f*actor), porina de membrana externa. Entre paréntesis, se indica el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos para cada proteína respecto a cada componente, MexA, MexB y OprM de Pto DC3000.

Agua arriba y en sentido opuesto a la transcripción de los genes estructurales *mexAB-oprM* de Pto DC3000, se identificó un gen que codifica un regulador transcripcional: *pmeR* (*Pseudomonas multdrug efflux regulator*, PSPTO_4302) (Stoitsova *et al.*, 2008). La secuencia de aminoácidos deducida para PmeR presenta un alto grado de identidad con miembros de la familia de represores transcripcionales de TetR (Ramos *et al.*, 2005). Al buscar en las bases de datos proteínas similares, aparecieron en primer lugar las de los diferentes patovares del complejo *P. syringae* (95% de identidad) que también se disponen en el genoma de la misma manera: se encuentran en 5' y parecen transcribirse divergentemente con respecto al operón que codifica la bomba tripartita (Figura 11).

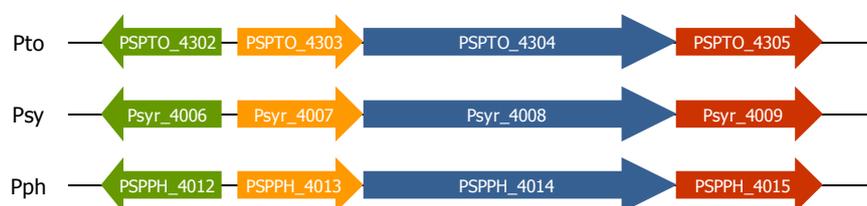


Figura 11. Organización de los genes del transportador RND MexAB-OprM y su posible regulador en tres patovares de *P. syringae*.

Representación esquemática de la organización de los tres genes que codifican la bomba MexAB-OprM en *P. syringae* pv. *tomato*, *syringae* y *phaseolicola* y el gen *pmeR* de la familia de reguladores TetR, que se transcribe en sentido opuesto a los genes de la bomba.

Por otra parte, PmeR resultó ser similar a reguladores de *P. fluorescens* (68-74% de identidad), como EmhR (Hearn *et al.*, 2003), de *P. putida* (66-67% de identidad), como TtgR (Terán *et al.*, 2003) y de *Erwinia* (42-44% de identidad), como AcrR de *E. amylovora* (Burse *et al.*, 2004a), entre otros. Sin embargo, no se encontró homología significativa con MexR, proteína de la familia de reguladores transcripcionales MarR que actúa como represor de la bomba *mexAB-oprM* de *P. aeruginosa* (Poole *et al.*, 1996). La homología del producto del gen *pmeR* con proteínas represoras anteriormente descritas y su proximidad al operón de la bomba de eflujo sugiere que PmeR podría regular la expresión de MexAB-OprM e incluso, su propia expresión, como es el caso de otros reguladores de la familia TetR (Aramaki *et al.*, 1995; Guilfoile y Hutchinson, 1992; Hillen y Berens, 1994; Terán *et al.*, 2003).

6. Flavonoides

Los flavonoides constituyen una familia relativamente diversa de moléculas aromáticas producidas por las plantas, que se sintetizan a partir de la fenilalanina y del malonil-CoA. La fenilalanina, derivada a su vez del corismato, es el punto de partida de las rutas biosintéticas de los estilbenoides, los fenilpropanoides y los flavonoides (Dixon *et al.*, 1996). El término "flavonoide" se utiliza generalmente para describir una amplia colección de productos naturales que poseen un esqueleto carbonado C6-C3-C6 o, más específicamente, fenilbenzopirano. Dependiendo de la posición de la unión del anillo aromático al núcleo de benzopirano (cromano), este grupo de productos naturales puede dividirse en dos clases: los flavonoides (2-fenilbenzopiranos) y los isoflavonoides (3-benzopiranos). La diversidad estructural de los flavonoides naturales depende del grado de oxidación y de la saturación del heterociclo, combinado con hidroxilaciones, alquilaciones, glicosilaciones, oligomerizaciones, etc.

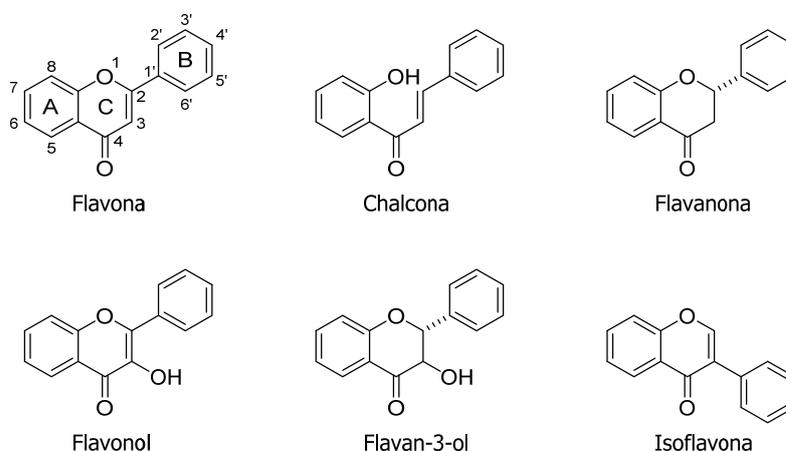


Figura 12. Modelos estructurales de flavonoides.

Estructura básica del esqueleto carbonado de los flavonoides y ejemplos de su diversidad estructural.

En contraste con los metabolitos primarios que son esenciales para el crecimiento vegetativo, los flavonoides confieren a las plantas rasgos fenotípicos que las hacen atractivas para la polinización como son el color, el sabor y el aroma de sus flores y sus frutos. Sus actividades biológicas son muy diversas, ya que actúan como polifenoles (con actividad antioxidante, absorción de rayos UV, desnaturalización de proteínas, formación de quelatos, etc), como análogos de esteroides (con actividad estrogénica, regulación de la proliferación celular, etc.), como agentes defensivos de las plantas (con actividad antifúngica, insecticida, antibacteriana y alelopática), como sustancias de señal entre autótrofos y heterótrofos (en simbiosis, patogenia, alimentación y deposición de huevos), como antídotos contra fungicidas, herbicidas y venenos de serpiente, y como inhibidores de diversos enzimas (Tahara, 2007).

Las plantas responden activamente al estrés causado por heridas mecánicas o por el ataque de insectos y microbios mediante la producción de fitoalexinas y otros metabolitos de estrés que pueden inducir la producción de respuestas de defensa en el sitio de la lesión o sistémicamente en tejidos distantes. Se ha observado la acumulación de flavonoides e isoflavonoides en respuesta al ataque de patógenos en muchas especies de plantas, y su importancia como fitoalexinas antimicrobianas está bien establecida (Pueppke y VanEtten, 1976) . Más aún, se han elucidado los mecanismos de acción de varios flavonoides en bacterias, demostrándose que actúan sobre múltiples dianas celulares (revisado por Cushnie y Lamb, 2005, 2011). Los flavonoides provocan daños en la membrana citoplasmática por perforación y/o reducción de su fluidez (Ikigai *et al.*, 1993; Tsuchiya y linuma, 2000); impiden la síntesis de ácidos nucleicos al inhibir las topoisomerasas y/o ADN girasas (Bernard *et al.*, 1997; Gradisar *et al.*, 2007; Navarro-Martínez *et al.*, 2005; Plaper *et al.*, 2003); paralizan el metabolismo energético al inhibir la NADH-citocromo C reductasa y la ATP sintasa (Chinnam *et al.*, 2010; Haraguchi *et al.*, 1998); impiden la síntesis de pared celular actuando como inhibidores competitivos de la D-alanina-D-alanina ligasa (Wu *et al.*, 2008) y de la membrana celular inhibiendo enzimas de la ruta de síntesis de ácidos grasos, como FabG, FabI o FabZ (Zhang y Rock, 2004). Además, se ha demostrado que los flavonoides poseen actividad sinérgica y moduladora de la resistencia a antibióticos y atenúan la patogenicidad bacteriana mediante la inhibición de varios factores de virulencia: enzimas, toxinas, receptores de señales *quorum sensing*, etc. Esto provoca la inhibición de la formación de biopelículas *in vitro*, de la adhesión bacteriana al hospedador, de la secreción de factores de virulencia o la neutralización de la citotoxicidad (Choi *et al.*, 2007; Delehanty *et al.*, 2007; Vandeputte *et al.*, 2010, 2011; Vikram *et al.*, 2010, 2011). Por tanto, cada vez se conoce mejor la acción antibacteriana de diferentes flavonoides; sin embargo, el conocimiento sobre la respuesta específica de las bacterias

frente a estos productos vegetales y el modo en que se integra en las cascadas reguladoras celulares es más limitado.

Las plantas hospedadoras de Pto producen un gran número de compuestos para protegerse frente a la acción de diversos patógenos, siendo mayoritarios los flavonoides y los isoprenoides. Así, la calconaringenina es el flavonoide más abundante en tomate, seguido por glicósidos de quercetina y floretina (Slimestad *et al.*, 2008). En *A. thaliana* se han aislado glicósidos de kaempferol y quercetina en hojas y compuestos con actividad biocida, como el metilparabeno, en exudados de raíz (Bais *et al.*, 2005; Sheahan y Cheong, 1998; Veit y Pauli, 1999). Además, se ha demostrado que la infección con Pto DC3000 induce la producción de diferentes compuestos: camalexina y diferentes derivados del indol en *A. thaliana*, mientras que en tomate se detectan altas concentraciones de ácidos orgánicos, rutina (quercetina glicosilada) y fenilpropanoides (Hagemeyer *et al.*, 2001; López-Gresa *et al.*, 2010, 2011).

OBJETIVOS

El presente trabajo se ha centrado en *P. syringae* pv. tomato DC3000, bacteria causante de la mancha negra del tomate y patógena de la planta modelo *A. thaliana*. Pto DC3000 es utilizada como modelo para el estudio de la interacción patógeno-hospedador y la secuenciación de su genoma (Buell *et al.*, 2003) ha permitido el estudio de genes con funciones de interés. DC3000 posee un amplio repertorio de sistemas de transporte, de los que 12 están anotados como transportadores de tipo RND. Aunque se ha demostrado la existencia y el papel de transportadores RND en algunas bacterias fitopatógenas, la función de los mismos y, sobre todo su regulación, estaba menos estudiada en *P. syringae* al inicio de este trabajo de tesis.

El objetivo principal de esta tesis ha sido el estudio de la respuesta de Pto DC3000 a flavonoides producidos por las plantas. Los objetivos específicos fueron:

1. Determinar el papel del sistema PmeR/MexAB-OprM en la resistencia a flavonoides, mediante:
 - a. El análisis de la expresión del sistema PmeR/MexAB-OprM y su control a nivel transcripcional, para determinar su papel fisiológico en Pto DC3000.
 - b. La caracterización bioquímica y funcional de la proteína reguladora PmeR.
2. Evaluar la acción de los flavonoides sobre algunos factores de virulencia de Pto DC3000, concretamente, motilidad y expresión del sistema de secreción tipo III, identificando los genes y las rutas reguladoras afectadas.

MATERIALES Y
MÉTODOS

1. Cepas bacterianas

La cepa objeto de este estudio es *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Pto DC3000, Cuppels, 1986). Las demás cepas bacterianas utilizadas derivadas de Pto DC3000 incluyen los mutantes generados en los genes de interés y algunas cepas de *E. coli* empleadas principalmente como hospedadoras de plásmidos. La lista de cepas utilizadas y sus características más relevantes se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas bacterianas

Cepa	Característica	Referencia
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato		
DC3000	Rif ^R , cepa parental	Cuppels, 1986
DC3000A	Km ^R , <i>mexA::ΩKm</i>	Vargas <i>et al.</i> , 2011
DC3000R	Km ^R , <i>pmeR::ΩKm</i>	Vargas <i>et al.</i> , 2011
<i>fleQ</i>	Km ^R , <i>fleQ::ΩKm</i>	H. Prada, no publicado
<i>fliC</i>	Cm ^R , <i>fliC (flaA)::mini-Tn5Cm</i>	Hu <i>et al.</i> , 2001
<i>gacA</i> (AC811)	Km ^R , <i>gacA::mini-Tn5Km</i>	Chatterjee <i>et al.</i> , 2003
<i>hrpL</i>	Km ^R , <i>hrpL::nptII</i>	I. Aragón, no publicado
<i>hrpS</i>	Rif ^R , Δ <i>hrpS</i>	C. Waite., no publicado
<i>pilA</i>	Sp ^R /Sm ^R , <i>pilA::ΩSp/Sm</i>	Roine <i>et al.</i> , 1998
<i>pilD</i>	Sp ^R /Sm ^R , <i>pilD::ΩSp/Sm</i>	Roine <i>et al.</i> , 1998
<i>rpoS</i> (AC822)	Km ^R , <i>rpoS::Tn(KAN-2)</i>	Chatterjee <i>et al.</i> , 2007
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	Nal ^R <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi-1 ΔlacU169 (Φ80lacΔM15)</i>	Hanahan, 1983
JM109	Nal ^R <i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB) F' (traD36 proAB+ lacI^q lacZΔM15)</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
B834(DE3)	<i>F-, ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met</i>	Novagen

2. Plásmidos

2.1. Plásmidos utilizados en este trabajo

Las principales características de los plásmidos utilizados en este trabajo se recogen en la tabla 4.

Tabla 4. Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Característica	Referencia
pET-29a(+)	Km ^R , vector para la expresión inducible de proteínas	Novagen
pCR-XL-TOPO	Km ^R , vector de clonación para ligar productos de PCR (A-T)	Invitrogen
pGEM-T	Ap ^R , vector de clonación para ligar productos de PCR (A-T)	Promega
pBBR1MCS	Cm ^R , vector de clonación	Kovach <i>et al.</i> , 1994
pHP45ΩKm	Ap ^R , Km ^R , plásmido portador del interposón ΩKm de 2.25 kb	Fellay <i>et al.</i> , 1987
pJB3Tc19	Ap ^R , Tc ^R , vector de clonación de bajo número de copias	Blatny <i>et al.</i> , 1997
pLRM1-GFP	Gm ^R , plásmido derivado de pBBR1-MCS5 con un fragmento de 2,05 kb la fusión del promotor inducible P _{A1/04/03} al gen <i>gfpmut3*</i>	Rodríguez-Moreno <i>et al.</i> , 2009
pMBL-T	Ap ^R , vector de clonación para ligar productos de PCR (A-T)	Dominion-MBL
pMEX	Cm ^R , plásmido derivado pBBR1MCS con un fragmento <i>SacI</i> que contiene el operón completo <i>mexAB-oprM</i> de Pto DC3000	H. Weingart
pMP220	Tc ^R , portador del gen <i>lacZ</i> sin promotor para la construcción de fusiones transcripcionales	Spaink <i>et al.</i> , 1987

2.2. Plásmidos construidos en este trabajo

Las principales características de los plásmidos construidos se recogen en la tabla 5.

Tabla 5. Plásmidos construidos en este trabajo

Plásmido	Característica	Referencia
pMBL_PmA	Ap ^R , derivado de pMBL-T con un fragmento de 262 pb que contiene la región promotora P _{mexAB-oprM} amplificada por PCR y flanqueada por sitios generados para <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i>	Este trabajo
pMBL_PmR	Ap ^R , derivado de pMBL-T con un fragmento de 263 pb que contiene la región promotora P _{pmeR} amplificada por PCR y flanqueada por sitios generados para <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i>	Este trabajo
pGEM-PpmeR-IR	Ap ^R , derivado de pGEM-T con un fragmento de 210 pb que contiene la región promotora P _{pmeR-IR} amplificada por PCR y flanqueada por sitios generados para <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i>	Este trabajo
pPV1A	Tc ^R , fusión transcripcional P _{mexAB-oprM::lacZ} , la región promotora de <i>mexAB-oprM</i> se insertó entre los sitios <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> de pMP220	Vargas <i>et al.</i> , 2011
pPV2R	Tc ^R , fusión transcripcional P _{pmeR::lacZ} , la región promotora de <i>pmeR</i> se insertó entre los sitios <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> de pMP220	Vargas <i>et al.</i> , 2011
pPV2R-IR	Tc ^R , fusión transcripcional P _{pmeR-IR::lacZ} , la región promotora de <i>pmeR</i> sin la secuencia IR, se insertó entre los sitios <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> de pMP220	Este trabajo

pPV3	Km ^R , vector derivado de pET-29a(+) con un fragmento de 672 pb, que contiene el gen <i>pmeR</i> insertado entre los sitios <i>NdeI</i> y <i>HindIII</i> , para la expresión de la proteína nativa PmeR	Vargas <i>et al.</i> , 2011
pPV4R	pJB3Tc19 con el gen <i>pmeR</i> insertado en el sitio <i>EcoRI</i>	Vargas <i>et al.</i> , 2011
pPVG-A	Ap ^R , derivado de pMBL con un fragmento cromosomal de 2.106 pb que contiene el gen <i>mexA</i> con un sitio <i>Eco47III</i> a 440 pb de su ATG	Vargas <i>et al.</i> , 2011
pPVG-AΩKm	Ap ^R , pPVG-A con el interposón ΩKm insertado en el sitio <i>Eco47III</i>	Vargas <i>et al.</i> , 2011
pPVG-R	Ap ^R , derivado de pGEM-T con un fragmento cromosomal de 1.805 pb que contiene el gen <i>pmeR</i> con un sitio generado para <i>EcoRI</i> a 198 pb de su ATG	Vargas <i>et al.</i> , 2011
pPVG-RΩKm	Ap ^R , pPVG-R con el interposón ΩKm insertado en el sitio <i>EcoRI</i>	Vargas <i>et al.</i> , 2011
pPmfliC	Tc ^R , fusión transcripcional P _{fliC} :: <i>lacZ</i> , la región promotora de <i>fliC</i> , se insertó entre los sitios <i>KpnI</i> y <i>PstI</i> de pMP220	Este trabajo
pPmfleQ	Tc ^R , fusión transcripcional P _{fleQ} :: <i>lacZ</i> , la región promotora de <i>fleQ</i> , se insertó entre los sitios <i>KpnI</i> y <i>PstI</i> de pMP220	Este trabajo
pPmflgF	Tc ^R , fusión transcripcional P _{flgF} :: <i>lacZ</i> , la región promotora de <i>flgF</i> , se insertó entre los sitios <i>KpnI</i> y <i>PstI</i> de pMP220	Este trabajo

pPV1A y pPV2R

Plásmidos que portan la fusión transcripcional P_{mexA}::*lacZ* y P_{pmeR}::*lacZ*, respectivamente. La región intergénica *pmeR-mexA* de 254 pb fue amplificada por PCR usando como molde ADN cromosómico de Pto DC3000 con cebadores que incorporan los sitios de restricción *EcoRI* y *PstI*. Se utilizaron los cebadores *EcoRI*-PmexA1 y PmexA-PstI2 para crear la fusión transcripcional del promotor *mexAB-oprM* a *lacZ*; y los cebadores PstI-PpmeR1 y PpmeR-EcoRI2 (para generar la fusión del promotor *pmeR* a *lacZ*. El producto de amplificación se clonó en el vector pMBL-T, generando los plásmidos pMBL_PmA y pMBL_PmR que se secuenciaron para verificar la ausencia de mutaciones en las correspondientes regiones promotoras. Los plásmidos pMBL_PmA y pMBL_PmR se digirieron con *EcoRI* y *PstI*, y los fragmentos con la región intergénica se ligaron al vector pMP220 digerido con las mismas enzimas, obteniéndose los plásmidos pPV1A (P_{mexA}::*lacZ*) y pPV2R (P_{pmeR}::*lacZ*).

pPV2R-IR

Plásmido que porta la fusión transcripcional P_{pmeR-IR}::*lacZ* del promotor *pmeR* sin la secuencia IR. Un fragmento de 210 pb correspondiente a la región intergénica *pmeR-mexA* sin la secuencia IR fue amplificado por PCR usando como molde ADN cromosómico de Pto DC3000 con cebadores que incorporan los sitios de restricción *PstI* y *EcoRI*. Se utilizaron los cebadores PstI-PpmeR-IR y PpmeR-EcoRI2 para generar la fusión del promotor modificado *pmeR-IR* a *lacZ*. El producto de amplificación se clonó en el vector pGEM-T, generando el plásmido pGEM_PpmeR-IR que se secuenció para verificar la ausencia de mutaciones en la región promotora. El plásmido pGEM_PpmeR-IR se digirió con *EcoRI* y *PstI*, y el fragmento con la región intergénica se ligó al vector pMP220 digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido pPV2R-IR (P_{pmeR-IR}::*lacZ*).

pPV3

Plásmido derivado del vector pET-29a (+) en el que se insertó un fragmento de 672 pb que contiene el gen *pmeR* amplificado a partir de ADN cromosómico de Pto DC3000 con los cebadores 5-*pmeR_Pto*, que genera el sitio de restricción *NdeI*, y 3-*pmeR_Pto*, con el sitio de restricción para *HindIII* y dos codones de parada (en negrita). El producto de PCR se digirió con *NdeI* y *HindIII* y se ligó al vector pET-29a (+), previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, generando así el plásmido pPV3. La correcta inserción e integridad del gen insertado se comprobó mediante secuenciación.

pPV4R

Plásmido construido para complementar el mutante deficiente en *PmeR*. Porta un fragmento de 1.36 kb, que contiene el gen *pmeR*, generado por PCR con los cebadores ext*PmeR_F* y P*pmeR-EcoRI2* a partir de ADN cromosómico de Pto DC3000. El producto de amplificación se clonó en el vector pCR-XL-TOPO y se secuenció para verificar la integridad de la secuencia de *pmeR*. Tras la digestión con *EcoRI*, el fragmento se ligó en el plásmido pJB3Tc19 previamente digerido con *EcoRI*. El sentido de la inserción se verificó mediante PCR. El plásmido resultante pPV4R contiene el gen *pmeR* de Pto DC3000.

pPVG-A y pPVG- Ω Km

pPVG- Ω Km es un plásmido que porta el gen *mexA* interrumpido con el interposón Ω Km que se utilizó para mutar el gen silvestre mediante reemplazamiento génico en la cepa Pto DC3000. El gen *mexA* se amplificó por PCR a partir de ADN cromosómico de Pto DC3000 con los cebadores prem*exA* y RTmAB- y el fragmento resultante de 2.106 pb se clonó en el vector pMBL-T, generando el plásmido pPVG-A. El plásmido se digirió con *Eco47III*, cuyo sitio de reconocimiento está situado aproximadamente 440 pb después del ATG de *mexA*, y se ligó al interposón Ω Km (con sitios *Eco47III* adicionados en sus extremos), generando el plásmido pPVG- Ω Km. El plásmido pPVG- Ω Km no se replica en *Pseudomonas* sp, confiere resistencia a ampicilina y kanamicina, y se utilizó para el reemplazamiento génico tras su electroporación.

pPVG-R y pPVG-R Ω Km

pPVG-R Ω Km es un plásmido que porta el gen *pmeR* interrumpido con el interposón Ω Km que se utilizó para reemplazar el gen silvestre en la cepa Pto DC3000. Con el fin de insertar un sitio de corte para *EcoRI* en mitad del gen *pmeR* se llevaron a cabo varias reacciones de PCR solapantes. Por una parte, se amplificó una región de 926 pb con los cebadores ext*pmeR_F* e int*pmeR_R*, que incluye la primera mitad del gen *pmeR*, y por otra, se amplificó una región de 900 pb que incluye la segunda mitad del gen utilizando los cebadores int*pmeR_F* y ext*pmeR_R*. Los dos productos de amplificación se purificaron y utilizaron como ADN molde para una nueva PCR realizada con el par de cebadores externos (ext*pmeR_F* y ext*pmeR_R*). Así se obtuvo una región de 1.805 pb que se clonó en el vector pGEM-T dando lugar al plásmido pPVG-R, que contiene el gen *pmeR* con un sitio de corte para *EcoRI* aproximadamente 198 pb después de su ATG.

Tras la digestión del plásmido pPVG-R con *EcoRI*, éste se ligó con un fragmento *EcoRI* de 2250 pb que portaba el interposón Ω Km proveniente del plásmido pHP45- Ω Km. Los clones obtenidos se verificaron por PCR

y por restricción con *EcoRI*. El plásmido resultante pPVG-RQKm, vector suicida en *Pseudomonas*, porta resistencia a ampicilina y kanamicina y se utilizó para el reemplazamiento génico.

pPmfliC, pPmfleQ y pPmflgF

Plásmidos que portan las fusiones transcripcionales de los promotores *fliC*, *fleQ* y *flgF*, respectivamente, a *lacZ*. Un fragmento de 339 pb correspondiente al promotor de *fliC* fue amplificado por PCR usando como molde ADN cromosómico de Pto DC3000 con los cebadores *fliC_Pst_KpnI* y *fliC_Pst_PstI* que incorporan los sitios de restricción *KpnI* y *PstI* para hacer la fusión a *lacZ*. El producto de amplificación se digirió con *KpnI* y *PstI* y se ligó al vector pMP220 digerido con las mismas enzimas, obteniéndose el plásmido pPmfliC ($P_{mic}::lacZ$), que se secuenció para verificar la ausencia de mutaciones en la región promotora. La construcción para las fusiones de los promotores *fleQ* y *flgF*, se realizó de la misma manera, pero utilizando los correspondientes cebadores (Tabla 6).

2.3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo han sido sintetizados por Sigma, la secuencia y características de los oligonucleótidos utilizados para PCR se especifican en la Tabla 6.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo para la amplificación de productos por PCR

Cebadores	Secuencia (5' → 3')	Características
premexA RTmAB-	GGTTCCTGAAGGCTGTCGAG TTCGAGACGATGTAGTTGG	Amplifican una región de 2.106 pb que contiene <i>mexA</i>
extpmeR_F intpmeR_R	TGAACCGCGCTTGCGCTCAT GCTCGACAGAATTCAGGAACC	Amplifican una región de 926 pb que incluye la primera mitad del gen <i>pmeR</i> , generando un sitio de corte para <i>EcoRI</i>
intpmeR_F extpmeR_R	GGTTCCTGAATTCTGTCGAGC GCTGCCTGTGCTTCTCTGAGT	Amplifican una región de 900 pb que incluye la segunda mitad del gen <i>pmeR</i> , generando un sitio de corte para <i>EcoRI</i>
Ω Km_ <i>Eco47III</i>	NNNAGCGCTTTATGCTTGTAACCG	Amplifica el interposón Ω Km añadiendo sitios <i>Eco47III</i> en sus extremos
<i>EcoRI</i> -PmexA1 PmexA-PstI2	AAAAGAATTCGACCTCAAAGATTC AAAAAACTGCAGCCTCGGGGCAGG	Amplifican un fragmento de 262 pb de la región intergénica <i>pmeR-mexA</i> incorporando sitios de restricción en los extremos para <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i> , respectivamente
PstI-PpmeR1 PpmeR- <i>EcoRI</i> 2	AAAAAACTGCAGAAGACCTCAAAGATTC AAAAGAATTCCTCGGGGCAGG	Amplifican un fragmento de 263 pb de la región intergénica <i>pmeR-mexA</i> incorporando sitios de restricción en los extremos para <i>PstI</i> y <i>EcoRI</i> , respectivamente
Z18	GATGTGCTGCAAGGCGAT	Hibrida en el plásmido pMP220 en <i>lacZ</i> a 294 pb del sitio <i>PstI</i>
pJB3Tc19_F pJB3Tc19_R	GCCTCTTCGCTATTACGCC TGTGTGGAATTGTGAGCGG	Cebadores utilizados para verificar los fragmentos clonados en el vector pJB3Tc19
U21 (universal) R21 (reverso)	GTAAAACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGAC	Cebadores utilizados para verificar y secuenciar los fragmentos clonados en los vectores pGEM-T y pMBL-T

5-pmeR_Pto 3-pmeR_Pto	AAAAAACATATGGTTCGTCGCACCAAAG AAAAAAAAGCTTTCATCATAACCTTTTCACG	Amplifican una región de 690 pb que incluye el gen <i>pmeR</i> , generando un sitio de corte para <i>NdeI</i> y un sitio para <i>HindIII</i> y dos codones de parada (en negrita).
PstI-PpmeR1 PpmeR-EcoRI2	AAAAAACTGCAGAAGACCTCAAAGATTC AAAAGAATTCCTCGGGGCAGG	Amplifican un fragmento de 263 pb de la región intergénica <i>pmeR-mexA</i> incorporando sitios de restricción en los extremos para <i>PstI</i> y <i>EcoRI</i> , respectivamente
PstI-PpmeR-IR PpmeR-EcoRI2	AAAACCTGCAGATGACCGGGCGGCATTTGTCTC AAAAGAATTCCTCGGGGCAGG	Amplifican un fragmento de 210 pb de la región intergénica <i>pmeR-mexA</i> sin la secuencia IR, incorporando sitios de restricción en los extremos para <i>PstI</i> y <i>EcoRI</i> , respectivamente
fliC_Pto_KpnI fliC_Pto_PstI	AAAAAAGGTACCGCAGGCTAAAAGAG AAAAAACTGCAGTCCTCGTTGG	Amplifican una región de 339 pb que incluye la región intergénica entre PSPTO_1948 y la ORF de <i>fliC</i> (PSPTO_1949), incorporando sitios de restricción en los extremos para <i>KpnI</i> y <i>PstI</i>
fleQ_Pto_KpnI fleQ_Pto_PstI	AAAAAAGGTACCTGATAATTGTC AAAAAACTGCAGCAATAGCAAC	Amplifican una región de 180 pb que incluye la región intergénica entre PSPTO_1953 y la ORF de <i>fleQ</i> (PSPTO_1954), incorporando sitios de restricción en los extremos para <i>KpnI</i> y <i>PstI</i>
flgF_Pto_KpnI flgF_Pto_PstI	AAAAAAGGTACCGCGTATCGATG AAAAAACTGCAGTCTTCCTCC	Amplifican una región de 244 pb que incluye la región intergénica entre PSPTO_1938 y la ORF de <i>flgF</i> (PSPTO_1939), incorporando sitios de restricción en los extremos para <i>KpnI</i> y <i>PstI</i>

3. Medios y condiciones de cultivo

3.1. Medios

Todos los medios y soluciones se esterilizaron por calor húmedo en autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Algunas soluciones se esterilizaron por filtración, utilizando filtros estériles de nitrocelulosa de 0,22 µm de diámetro de poro.

3.1.1. Medios ricos

El cultivo habitual de las distintas cepas de Pto y de *E. coli*, se realizó en el medio Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972). Los ensayos de difusión en placa, se realizaron en LB con agar a una concentración final de 1% (p/v). Los ensayos de motilidad bacteriana tipo *swimming* se llevaron a cabo en medio LB semisólido y los ensayos de motilidad tipo *swarming* en medio PG-Agar (Matilla *et al.*, 2007). La sobreexpresión de proteínas en *E. coli* B834(DE3) se realizó en el medio 2xYT (Sambrook *et al.*, 1989). La composición de los medios de cultivo utilizados en este trabajo se detalla en la tabla 7.

3.1.2. Medios mínimos

En algunos ensayos se utilizó un medio inductor del sistema de secreción tipo 3 denominado MMF que simula la composición del apoplasto vegetal (Huynh *et al.*, 1989) y cuya composición se detalla en

la tabla 7. Las soluciones madre empleadas para este medio se prepararon por separado y se esterilizaron en el autoclave. Para la preparación de medio mínimo MMF semisólido para los ensayos de motilidad bacteriana, se utilizó MMF suplementado con solución A9 de micronutrientes (Abril *et al.*, 1989) y agar bacteriológico a una concentración final de 0,3% (p/v).

Tabla 7. Composición de medios utilizados en este estudio

Medio	Composición	
Medios ricos		
LB	Bactotripton	10 g
	Extracto de levadura	5 g
	NaCl	5 g
	Agua destilada	1 L
	Ajustar a pH 7,0	
LB sólido	Medio LB Agar bacteriológico	15 g/L
LB semisólido	Medio LB Agar bacteriológico	3 g/L
Medio PG-Agar	Proteosa-peptona No.3 (Difco 211693)	5 g
	Glucosa	2 g
	Bacto-agar (Difco 214010)	5 g
	Agua destilada	1 L
Medio 2xYT	Bactotripton	16 g
	Extracto de levadura	10 g
	NaCl	5 g
	Agua destilada	1 L
Medios mínimos		
MMF	Tampón fosfato de potasio, pH 5,7	50 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	7,6 mM
	MgCl ₂	1,7 mM
	NaCl	1,7 mM
	Fructosa	10 mM
MMF semisólido	Medio MMF	
	Solución de micronutrientes A9	0,25% (v/v)
	Agar bacteriológico	3 g/L
Solución A9 de micronutrientes	HBO ₃	300 mg
	ZnCl ₂	50 mg
	MnCl ₂ x 4H ₂ O	30 mg
	CoCl ₂	200 mg
	CuCl ₂ x 2H ₂ O	10 mg
	NiCl ₂ x 6H ₂ O	20 mg
	NaMoO ₄ x 2H ₂ O	30 mg
	Agua destilada	1 L

3.2. Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en soluciones mil veces concentradas en agua destilada (H₂O_d), excepto el cloramfenicol, que se preparó en etanol, y la rifampicina y tetraciclina, que se disolvieron en metanol. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración y se almacenaron en

pequeñas alícuotas a -20°C . Las concentraciones finales (en $\mu\text{g/ml}$) de los antibióticos precisados en los diferentes protocolos se indican en la tabla 8.

Tabla 8. Antibióticos utilizados en este estudio

Antibiótico	Cepas de <i>E.coli</i>	Cepas de Pto
Ácido nalidíxico (Nal)	10	-
Ampicilina (Ap)	100	250
Cloramfenicol (Cm)	30	30
Espectinomicina (Spc)	-	30
Estreptomicina (Sm)	-	30
Gentamicina (Gm)	10	10
Kanamicina (Km)	25	50
Rifampicina (Rif)	-	10
Tetraciclina (Tc)	10	10 (DC3000) 1 (DC3000A)

3.3. Flavonoides

Los flavonoides (catequina, fletina, floridzina, genisteína, luteolina, morina, naringenina, quercetina) se prepararon a 0,5 M disolviéndolos en DMSO (dimetil sulfóxido, Sigma D8418) y se gasearon con N_2 durante al menos 10 minutos en botes de cristal, que se sellaron con tapón de teflón y se almacenaron a temperatura ambiente en oscuridad. Otros compuestos como butil parabeno, metil parabeno, indol y triclosan se prepararon a 0,5 M disolviéndolos también en DMSO y se almacenaron a -20°C .

3.4. Condiciones de cultivo

Para el crecimiento habitual en el laboratorio las estirpes de *P. syringae* y de *E. coli* se utilizó el medio rico LB a 28°C y 37°C , respectivamente. Los cultivos líquidos se incubaron con agitación de 200 rpm en una incubadora orbital Kuhner ISF-4-W (Adolf Kühner AG).

3.5. Conservación de los cultivos bacterianos

La conservación prolongada de los cultivos bacterianos se realizó por congelación. Este método se basa en la paralización del metabolismo celular al disminuir la disponibilidad de agua. Para que la viabilidad celular se mantenga durante el periodo de conservación es necesario adicionar un crioprotector que evita el daño que los cristales de agua ocasionarían en las paredes celulares. En nuestro caso se escogió glicerol, que se utilizó a una concentración de 30% (v/v). Así, a 450 μl de glicerol 60% (v/v) estéril dispuesto en criotubos, se le añadieron 450 μl de cultivo bacteriano crecido

hasta fase exponencial tardía. Los viales se congelaron rápidamente y se almacenaron a una temperatura de -80°C.

3.6. Transformación bacteriana

3.6.1. Preparación de células competentes de *E. coli*

La preparación de células competentes de *E. coli* para su posterior transformación por choque térmico se realizó con el método de Nishimura *et al.* (1990). A partir de un cultivo fresco en caja de Petri, la cepa correspondiente de *E. coli* se inoculó en 3 ml de LB con los antibióticos adecuados y se incubó a 37°C durante 12-14 horas en agitación. Este cultivo se diluyó 100 veces en 50 ml de solución A y se incubó nuevamente a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento ($DO_{660} = 0,4 - 0,6$). A partir de ese momento las células se mantuvieron siempre en frío para obtener la mayor eficiencia de transformación. Las células se mantuvieron durante 10 minutos en hielo y se recogieron por centrifugación a 10.000 g durante 5 min a 4°C. El sedimento celular se resuspendió cuidadosamente en 0,5 ml de solución A fría (4°C) a la que se añadieron 2,5 ml de solución B fría (4°C). Finalmente, la suspensión bacteriana se repartió en alícuotas de 125 µl que se conservaron a -80°C hasta el momento de su uso.

Solución A: LB suplementado con MgSO₄ 10 mM y glucosa 0,2% (p/v).

Solución B: LB suplementado con glicerol 36% (v/v); polietilenglicol-8000, 12% (p/v) y MgSO₄ 12 mM.

Ambas soluciones se conservaron a 4°C tras esterilizarlas por filtración.

3.6.2. Transformación de células competentes de *E. coli*

La transformación de células competentes de *E. coli* con ADN plasmídico se realizó utilizando el método descrito por Nishimura *et al.* (1990). Una alícuota de la suspensión celular almacenada a -80°C se descongeló en hielo, se le añadieron entre 10 y 50 ng de ADN plasmídico mezclando suavemente mediante agitación manual y se incubó en hielo durante 30 minutos. A continuación, se aplicó un choque térmico a 42°C durante 1 minuto y, a continuación, se incubó en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se añadió 1 ml de LB y las células se incubaron durante al menos 1 hora a 37°C con agitación para permitir la expresión de el(los) gen(es) de resistencia a antibiótico(s) codificado(s) en el plásmido introducido. Las células que habían adquirido el plásmido, y por tanto la resistencia al(los) antibiótico(s), se seleccionaron sembrando entre 100 y 200 µl de la suspensión celular en placas de LB sólido suplementado con el(los) antibiótico(s) adecuado(s). Las placas se incubaron a 37°C durante 16-24 horas.

En los casos en que los vectores permitían selección blancas/azules, se añadió también a las placas de LB 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal, 20 mg/ml en formamida) a una concentración final de 20 μ g/ml, y 1-isopropil- β -D-1-galactopiranosido (IPTG, 100 mM en agua desionizada estéril) a una concentración final de 100 μ M.

3.6.3. Preparación de células electrocompetentes

La electroporación es el método más utilizado para transferir ADN plasmídico a las cepas de *Pseudomonas*. Para llevarlo a cabo, es necesario que las células sean electrocompetentes y se precisa la eliminación de las sales del medio de cultivo, de manera que no interfieran con la electroporación.

La preparación de células competentes de Pto DC3000 para electroporación se realizó mediante el método descrito por Choi *et al.* (2006). A partir de un cultivo de 12-16 horas crecido a 28°C en LB líquido suplementado con los antibióticos correspondientes, se recuperaron las células de 4 ml de cultivo por centrifugación a máxima velocidad durante 2 minutos. El sedimento celular, se lavó dos veces con 1 volumen de sacarosa 300 mM estéril a temperatura ambiente. Tras el último lavado, las células se resuspendieron en un volumen de 100 μ l de sacarosa 300 mM y se mantuvieron en hielo hasta el momento del pulso eléctrico.

3.6.4. Electrotransformación

A la suspensión celular se le añadió el ADN plasmídico libre de sales (entre 10 y 50 ng de ADN para plásmidos replicativos y entre 300-500 ng de ADN para plásmidos suicidas), se mezcló suavemente y la mezcla se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm de anchura previamente enfriada, donde recibieron un pulso eléctrico de 2,5 kV en un electroporador modelo 2510 (Eppendorf). Tras el pulso, las células se recuperaron inmediatamente añadiendo 1 ml de LB a temperatura ambiente y se incubaron durante 2 horas a 28°C con agitación. Finalmente, se sembraron entre 100 y 200 μ l de la suspensión celular en medio selectivo para los transformantes.

3.6.5. Selección de intercambio alélico y cointegración.

Los mutantes de pérdida de función de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 utilizados en este trabajo se obtuvieron mediante la técnica de reemplazamiento génico, utilizando los plásmidos pPVG-R Ω Km y pPVG-A Ω Km, en los que se clonó el gen a mutar interrumpido por el interposón Ω Km, de manera que hubiese suficiente secuencia de ADN, al menos 1 kb, a cada lado del interposón de kanamicina para permitir la recombinación homóloga. Los plásmidos usados para la mutagénesis, derivados de pGEM-T y pMBL-T respectivamente, no se replican en *Pseudomonas*.

Los plásmidos pPVG-R Ω Km y pPVG-A Ω Km, con resistencia a ampicilina y kanamicina, se electroporaron en Pto DC3000. Los transformantes se seleccionaron en placas de LB suplementado con kanamicina. Adicionalmente, se comprobó el crecimiento de las colonias Km^R en placas de LB suplementadas con ampicilina (250 μ g/ml) para determinar si cada transformante era el resultado de un único evento de recombinación (integración plasmídica, Amp^R) o de un doble evento de recombinación (intercambio alélico, Amp^S). Los mutantes deficientes en los genes de interés se confirmaron mediante PCR y mediante hibridación de ADN (*Southern Blot*) utilizando como sonda una secuencia complementaria al gen diana.

4. Ensayos *in vivo*

4.1. Curvas de crecimiento

Las cepas a estudiar se cultivaron a partir de un cultivo fresco en caja de Petri en 10 ml de LB suplementado con los antibióticos adecuados a 28°C y con agitación continua durante 10-12 horas. Los cultivos se diluyeron a una turbidez a 660 nm (DO₆₆₀) de partida comprendida entre 0,05 y 0,08 en el medio de estudio y se incubaron a 28°C con agitación continua. El incremento de la turbidez se determinó midiendo la DO₆₆₀ aproximadamente cada dos o tres horas, hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento. Las medidas de turbidez de los cultivos bacterianos se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, utilizando cubetas de plástico de 1 ml.

4.2. Ensayos de sensibilidad a compuestos antimicrobianos

4.2.1. Ensayos de MIC

Los estudios de sensibilidad a antibióticos y otros agentes antibacterianos se llevaron a cabo de forma rutinaria según el método de determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) (Amsterdam, 1991) en placas de microtítulo de 96 pocillos. Los antibióticos se prepararon concentrados cincuenta veces con respecto a la concentración inicial a ensayar. Las soluciones de antibióticos concentrados se diluyeron cincuenta veces en medio LB y 200 μ l de las mismas se depositaron en los pocillos de la primera columna de las placas de cultivo. En el resto de los pocillos de la placa se añadieron 100 μ l de medio LB. Con ayuda de una pipeta multicanal, se realizaron diluciones seriadas de los antibióticos, mezclando 100 μ l de la solución de antibiótico de la primera columna con los 100 μ l de LB de la segunda columna, y así sucesivamente. De esta manera, la concentración de antibiótico de cada columna de pocillos se diluye a la mitad con respecto a la anterior. Después de preparar las placas de cultivo con los antibióticos, se añadieron a cada uno de los pocillos 10 μ l de un cultivo de Pto

DC3000 (o de los mutantes) en fase de crecimiento exponencial ($DO \approx 0,8$) y diluido 1/100, de modo que en cada pocillo el título fuera de aproximadamente 10^6 UFC/ml. Las placas se incubaron a 28°C durante 24 horas y se determinó la concentración mínima de antibiótico capaz de inhibir en un 90% el crecimiento bacteriano analizando la turbidez en los pocillos de la placa de cultivo.

4.2.2. Ensayos de difusión en placa

Debido a la baja solubilidad de los flavonoides la determinación del MIC no se pudo realizar en placas de microtítulo. Para establecer la sensibilidad a distintos flavonoides de las cepas objeto de estudio con respecto a la silvestre, se llevó a cabo un ensayo de difusión en placas de agar, Las cepas se cultivaron en LB hasta alcanzar una DO_{660} de 1, tras lo cual se diluyeron 100 veces en LB (1% agar) y se depositaron en placas de Petri (35 ml por placa). Tras solidificarse, se hicieron pocillos de 5 mm de diámetro en el centro de la placa con una pipeta Pasteur estéril y el fondo se rellenó con 20 μl de LB (1% agar). En cada pocillo se colocaron 90 μl de la solución del compuesto a ensayar, utilizando DMSO como control. Las placas se incubaron a 26°C durante 24 horas, tras lo cual se observaron los halos de inhibición en torno a cada pocillo.

4.3. Ensayos de competencia en medio líquido

Para medir el grado de competitividad de las cepas mutantes, se inoculó una suspensión bacteriana mezcla en proporción 1:1 de la cepa silvestre y la mutante a estudiar en tubos con medio rico LB. El grado de competitividad se calculó como el porcentaje de cada cepa presente en el cultivo tras 24 horas. Para ello, las cepas bacterianas cultivadas durante 48 h a 28°C en placas de LB se resuspendieron en MgCl_2 10 mM, se lavaron dos veces, ajustándose la densidad celular a $DO_{660} = 0,5$ (correspondiente a 10^8 UFC/ml). A partir de estas suspensiones se preparó un inóculo mixto que contenía una proporción de células silvestres y mutantes 1:1 con 10^8 UFC/ml de cada cepa y de este inóculo se realizaron diluciones seriadas para obtener un título de $\approx 10^5$ UFC/ml. A partir de estas suspensiones, se confirmó tanto la dosis de cada cepa, como la proporción relativa entre ambas cepas; realizando diluciones seriadas y sembrando en placas de LB suplementado con rifampicina para la cepa silvestre y LB suplementado con kanamicina para las mutantes.

Para el ensayo de competencia en medio rico LB se inocularon 4,5 ml de LB con 0,5 ml del inóculo mixto a dos dosis bacterianas diferentes (10^5 y 10^8 UFC/ml), con lo que el cultivo partió de 10^4 y 10^7 UFC/ml, respectivamente. Tras incubar con agitación durante 24 horas a 28°C , se realizaron diluciones seriadas, que se sembraron en LB suplementado con los correspondientes antibióticos para calcular la proporción relativa entre las cepas.

4.4. Ensayos de motilidad bacteriana

4.4.1. Ensayos de *swimming*

A partir de placas de Pto DC3000 y mutantes crecidas en LB durante 48 a 28°C, se recogió biomasa resuspendiendo en MgCl₂ 10 mM y se ajustó a una DO₆₆₀ de 2,0. Alícuotas de 2 µl de esta suspensión se inocularon pinchando en el centro de placas de Petri preparadas con 25 ml de LB (0,3% agar) o MMF (0,3% agar) y se dejaron secar en la cabina de flujo laminar durante 5 minutos. Las placas se incubaron boca arriba a 25°C de 48 a 96 horas, según el medio utilizado. Se realizaron tres placas por condición y, al menos, 3 experimentos independientes.

El diámetro de halo de dispersión se midió cada 24 horas hasta las 48 horas en los ensayos de *swimming* realizados en LB y hasta las 96 horas en los ensayos en MMF. La motilidad se expresó como la media del diámetro del halo a las 48 horas (LB) o 96 horas (MMF) de incubación ± la desviación estándar, a partir de los datos de al menos 9 placas de motilidad para cada condición.

4.4.2. Ensayos de *swarming*

A partir de placas frescas de Pto DC3000 y mutantes crecidas en LB durante 48 a 28°C, se recogió biomasa resuspendiendo en MgCl₂ 10 mM y se ajustó a una DO₆₆₀ de 2,0. Alícuotas de 2 µl de esta suspensión se colocaron en la superficie de placas de Petri preparadas con 25 ml de PG-agar (0,5%) y se secaron en la cabina de flujo laminar durante 5 minutos. Las placas se incubaron a 25°C y la motilidad en superficie se observó a las 24 horas. Se utilizaron tres placas por condición y se realizaron al menos 3 experimentos independientes.

4.5. Ensayo enzimático de la actividad β-galactosidasa

La medida de actividad β-galactosidasa se llevó a cabo en células permeabilizadas según el método descrito por Miller (1972). Este método se basa en una reacción colorimétrica en la que el *o*-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la enzima β-galactosidasa, al ser hidrolizado por ésta produce galactosa y *o*-nitrofenol. Este último compuesto es de color amarillo y su intensidad puede medirse por espectrofotometría.

Cultivos celulares incubados a 28°C durante 14-16 horas, se diluyeron a una DO₆₆₀ inicial de 0,05 en 15 ml de medio LB (suplementado o no con un flavonoide) y se incubaron a 28°C en agitación hasta alcanzar la densidad óptica necesaria. Cuando el ensayo se realizó para determinar la actividad de los promotores en medio mínimo MMF, los cultivos celulares incubados a 28°C durante 14-16 horas, se diluyeron a una DO₆₆₀ inicial de 0,05 en 25 ml de medio LB y se incubaron a 25°C en agitación. Cuando

los cultivos alcanzaron una DO_{660} de 0,5; las células se recogieron por centrifugación a 3.200 g durante 8 minutos, se lavaron dos veces con MMF y se ajustó la densidad celular a $DO_{660} = 0,5$ en MMF (suplementado o no con floretina). Estos cultivos se incubaron a 25°C con agitación durante 3 horas más. Tras incubar hasta obtener la DO_{660} necesaria, se recogieron fracciones alícuotas de 100 μ l de los cultivos y se añadieron 20 μ l de SDS al 0,1% (p/v) y 20 μ l de cloroformo para permeabilizar las células.

El ensayo enzimático se llevó a cabo del siguiente modo: tras añadir 0,8 ml de tampón Z pH 7,0 (Na_2HPO_4 60 mM; NaH_2PO_4 40 mM; KCl 10 mM; $MgSO_4$ 1 mM y β -mercaptoetanol 50 mM) y 0,2 ml de una solución de ONPG (4 mg/ml en tampón fosfato 0,1 M pH 7,0), la mezcla de reacción se incubó a 30°C hasta la aparición de color (entre cinco minutos y media hora) y se detuvo añadiendo 2 ml de una solución de Na_2CO_3 0,5 M. La concentración de *o*-nitrofenol y la contribución de la turbidez celular en la reacción se determinaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 420 nm y 550 nm, respectivamente. Además, se determinó la densidad celular de los cultivos, midiendo su turbidez a 660 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada condición. La actividad β -galactosidasa, expresada en unidades Miller (UM), se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{1000 \times [DO_{420} - (1,7 \times DO_{550})]}{t \times V \times DO_{660}}$$

Donde t representa el tiempo en minutos y V el volumen en ml de la suspensión bacteriana utilizado para la reacción.

4.6. Ensayos de plantas

Los ensayos de infección de Pto DC3000, y los mutantes derivados de la misma, se realizaron en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) de cuatro o cinco semanas de edad y cultivadas en una cámara de crecimiento bajo condiciones de luz, humedad y temperatura controladas: fotoperiodo de día largo (16/8 h luz/oscuridad; 24/18°C día/noche) y una humedad relativa del 60%.

4.6.1. Preparación del inóculo

Las cepas bacterianas cultivadas durante 48 h a 28°C en placas de LB se resuspendieron en $MgCl_2$ 10 mM y se lavaron dos veces con $MgCl_2$ 10 mM, tras lo cual se ajustó la densidad celular a $DO_{660} = 0,5$ (correspondiente a 10^8 UFC/ml). Según el ensayo, se utilizó esta suspensión o se realizaron diluciones seriadas para obtener los inóculos a los títulos deseados. Siempre se confirmó el título de las suspensiones utilizadas realizando diluciones seriadas y sembrando en placas de LB suplementado con rifampicina para la cepa silvestre y en LB suplementado con kanamicina para las mutantes.

4.6.2. Ensayos de infección individual

Los ensayos de infección individual se realizaron con suspensiones de las cepas con aproximadamente 10^6 UFC/ml e inoculando por aspersión (3 veces por el haz y 3 veces por el envés) 5 foliolos de una hoja de tomate por planta. Como tratamiento control, las plantas se inocularon del mismo modo con $MgCl_2$ 10 mM. El análisis de la evolución de los síntomas y las densidades bacterianas *in planta* se realizaron 3 horas después de la inoculación (tiempo 0) y a diferentes días después de la inoculación (dpi, días post-inoculación).

Para determinar las densidades bacterianas *in planta* se extrajeron al menos 3 muestras por hoja, cada una de 5 discos extraídos con un sacabocados (diámetro 10 mm) y se maceraron por percusión mecánica (Agitador RW16 Basic, IKA®) en 1 ml de $MgCl_2$ 10 mM. A partir del macerado, se hicieron diluciones seriadas que se sembraron en medio LB suplementado con el correspondiente antibiótico para determinar el número de unidades formadoras de colonia por unidad de área (UFC/cm²).

4.6.3. Ensayos de competencia

Las plantas de tomate utilizadas para los ensayos de competencia se inocularon por aspersión con una suspensión bacteriana (10^6 UFC/ml) de la cepa silvestre y mutante en una proporción 1:1. Para ello, se preparó un inóculo mixto a partir de las suspensiones de cada cepa ajustadas a una DO_{660} de 0,5 (10^8 UFC/ml) y se realizaron diluciones seriadas para obtener el inóculo de $\approx 10^6$ UFC/ml (para cada cepa bacteriana). A partir de esta suspensión inicial, se confirmó, tanto la dosis de cada cepa como la proporción relativa entre ambas cepas, realizando diluciones seriadas y sembrando en placas de LB suplementado con rifampicina para la cepa silvestre y en LB suplementado con kanamicina para las mutantes. La inoculación por aspersión en las plantas de tomate, el análisis de la evolución de los síntomas y las densidades bacterianas *in planta*, se llevaron a cabo del mismo modo que en los ensayos de infección individuales.

4.7. Ensayos de auto-aglutinación

Las cepas de Pto utilizadas en este ensayo fueron previamente electroporadas con el plásmido pLRM1, que lleva la fusión del promotor $P_{A1/04/03}$ al gen *gfpmut3** (Tabla 4). Cultivos líquidos de las cepas de Pto crecidas en LB de 8 a 10 horas a 28°C, se diluyeron y ajustaron a una densidad óptica inicial de 0,2 en medio MMF sin y con floretina 0,15 mM. Tras dos días de incubación a 20°C, se tomaron 8 μ l de muestra de los cultivos y se colocaron sobre una gota de agarosa de bajo punto de fusión al 0,8% en un portaobjetos, para observarlas al microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioskope).

5. Técnicas de manipulación de ADN

5.1. Aislamiento de ADN

5.1.1. Aislamiento de ADN total

5.1.1.1. Extracción de ADN total mediante kit comercial

La extracción de ADN genómico de cepas de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 se realizó a partir de 3 ml de cultivos celulares incubados a 28°C durante 14-16 horas, y usando el kit de purificación de ADN *Wizard Genomic* (Promega Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo en agua milliQ estéril.

5.1.1.2. Lisados de colonia

Es una estrategia muy rápida para obtener ADN de Pto con una calidad suficiente para su amplificación por PCR. Para ello se resuspendió una colonia picada de placa en condiciones de esterilidad en 0,1 ml de agua desionizada estéril y se incubó a 100°C durante 2 minutos. Las células se sedimentaron por centrifugación a 15.000 g durante 2 minutos y el sobrenadante resultante se utilizó en la PCR.

5.1.2. Extracción de ADN plasmídico

Para la obtención de ADN plasmídico de alta pureza necesario en reacciones de secuenciación y/o clonación, se utilizó el sistema comercial *GenElut Plasmid Miniprep Kit* (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante y a partir de 3-5 ml de un cultivo en medio LB de la cepa portadora suplementado con los antibióticos necesarios, a temperatura óptima y en agitación durante 10-14 horas.

5.2. Determinación de la concentración de ADN

Se han empleado dos métodos para determinar la concentración de una solución de ADN. En primer lugar, utilizando el Nanodrop ND-1000 (Bio-Rad), un espectrofotómetro UV-visible que permite cuantificar rápidamente ADN, ARN, ácidos nucleicos marcados y proteínas en un limitado volumen de muestra (1-2 µl). Como segunda opción, se ha empleado el método descrito por Sambrook *et al.* (1989) consistente en la comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida.

5.3. Digestión de ADN con endonucleasas de restricción

La digestión de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima siguiendo las indicaciones, en cuanto a temperatura y tampón, del proveedor (Roche y New England Biolabs Inc). Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente cuando las enzimas requerían el mismo tampón y temperatura; en caso contrario, se digirió primero con la enzima que requería el tampón de menor fuerza iónica, adicionando posteriormente el tampón y la enzima para la segunda digestión. Cuando fue necesario la enzima de restricción se inactivó por calor o por purificación del ADN tras la electroforesis en gel de agarosa.

5.4. Reacción de defosforilación de ADN con fosfatasa alcalina

En ocasiones es necesaria la eliminación de los grupos fosfato presentes en los extremos 5' de vectores linearizados para que no vuelvan a ligarse. Esto evita el análisis de colonias que correspondan al vector religado que no contengan el inserto de interés.

Se añadió 1 unidad de de fosfatasa alcalina de gamba (Roche) por cada 5-10 pmoles de extremos 5' en tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM, pH 8,5; MgCl₂ 5 mM) y se incubó durante 1 h a 37°C. La reacción se detuvo por inactivación de la enzima con calor (15 minutos a 65°C).

5.5. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) consiste en la amplificación de un material de partida en ciclos sucesivos gracias al uso de una pareja de cebadores y a la enzima ADN polimerasa termoestable (Taq polimerasa). Este método se empleó para la amplificación de fragmentos de ADN del cromosoma de Pto DC3000 o de plásmidos portadores de genes o regiones de interés, de fragmentos a clonar añadiendo sitios de corte en los extremos para enzimas de restricción, para el análisis rutinario de colonias obtenidas tras la transformación de ligaciones con el fin de detectar de forma rápida el ADN insertado, y para la obtención de sondas marcadas con digoxigenina. La amplificación en cadena de la polimerasa consiste de 3 pasos fundamentales: desnaturalización, anillamiento y extensión.

Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos; 30 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización (94°C, 20 segundos), anillamiento del cebador (52-60°C, 20 segundos) y extensión (72°C, 1 minuto/kb); finalizando con un ciclo de extensión (72°C, 10 minutos). La temperatura de anillamiento se ajustó en función de los cebadores utilizados.

Según la finalidad, se utilizaron diferentes ADN polimerasas: High Fidelity (Roche) o AccuPrime Taq ADN polimerasa (Invitrogen), si era necesaria una baja tasa de errores en el producto final; mientras que para comprobaciones de rutina se usó Taq ADN-polimerasa de Roche.

En las comprobaciones de rutina, la reacción de amplificación contenía: tampón de reacción (Tris-HCl 10 mM pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM), dNTPs 0,1 mM, 0,2 μM de cada cebador, 10-50 ng de ADN molde y 0,5 unidades de Taq ADN-polimerasa (Roche) en un volumen final de 25 μl. Para el proceso se utilizó un termociclador Techne® TC-5000 (Bibby Scientific).

5.5.1. PCR de colonia

Es una estrategia rápida para la identificación de un plásmido o colonia recombinante de entre un conjunto de candidatos potenciales a partir de las colonias en placa. Con *E. coli* se reparten los 15-20 μl de la mezcla de reacción de PCR y, en lugar de poner el ADN molde, se pica directamente una colonia de la placa en esterilidad usando un palillo, agitando dentro de la mezcla y sometiendo a continuación a un programa de PCR estándar. Con Pto se utilizaron 2 μl de lisado de colonia (5.1.1.2) como molde para la PCR.

5.6. Clonaje de fragmentos

En este apartado se incluyen distintos protocolos utilizados habitualmente para el clonaje de insertos de interés en vectores.

5.6.1. Purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa

El aislamiento de fragmentos de restricción y de productos de amplificación obtenidos mediante PCR, separados por electroforesis horizontal en gel de agarosa se realizó con el sistema comercial *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y tras teñir el gel por inmersión en una solución de GelRed (Biotium, 100U/L).

5.6.2. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

La unión covalente de dos moléculas de ADN lineal se lleva a cabo utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Roche). La proporción molar más habitual vector:inserto suele ser 1:3, aunque puede variar dependiendo del tamaño de los fragmentos a clonar. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10-15 μl y a 14-16°C durante toda la noche.

5.6.3. Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación de las construcciones presentadas en este trabajo se realizó en el Servicio de Secuenciación de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada. Al ADN a secuenciar (0,2-1 µg) se le adicionó el cebador específico (6,4 picomoles) y agua milliQ hasta un volumen final de 12 µl. Este servicio de secuenciación amplifica las muestras con la polimerasa Amplitaq FS en un termociclador Perkin Elmer 9.600 y las secuencia en un secuenciador ABI 373 XL Stretch (Perkin-Elmer) usando el sistema comercial ABI PRISM Big Dye *Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin-Elmer).

Para la secuenciación manual del ADN se siguieron las instrucciones del sistema comercial *T7 sequencing kit* (GE Healthcare, ref. 27-1682-01), basado en el método de Sanger *et al.* (1977), usando la ADN-polimerasa del fago T7, pero con una modificación: en lugar de usar [α 32 P]-ATP, se utilizaron 5-10 pmoles del cebador correspondiente marcado en su extremo 5' con [γ 32 P]-ATP (véase apartado 6.4.1) y en la reacción de marcaje se añadió 0,8 µM de dATP sin marcar. Estas reacciones de secuenciación se utilizaron para determinar el inicio de transcripción mediante el análisis de extensión reversa a partir de cebador.

Las secuencias se visualizaron con el programa Chromas Lite 2.01. Los análisis de las secuencias de ADN y proteínas, búsqueda de sitios de restricción, diseño y análisis de oligonucleótidos, localización de posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), etc., se han realizado con el programa informático Clone Manager (Sci Ed Central). La búsqueda de homologías a nivel de ADN y proteína con secuencias conocidas presentes en las bases de datos se realizó con los distintos algoritmos del programa BLAST (Altschul y Koonin, 1998) disponibles en el servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>). El alineamiento de secuencias se realizó con el paquete informático Clustal X (Thompson *et al.*, 1997), y para su visualización se utilizó el programa BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). Los datos sobre el genoma de Pto DC3000 y de otros genomas se consultaron en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) o en la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).

5.7. Electroforesis de ADN

Consiste en la separación de macromoléculas en función de su tamaño y carga. Los ácidos nucleicos, con carga negativa, migran hacia el polo positivo.

5.7.1. Electroforesis en geles de agarosa

El análisis de productos de PCR, de ADN total, plasmídico o de fragmentos de ADN originados tras digestión con enzimas de restricción, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Sambrook *et al.*, 1989). Se utilizaron geles de agarosa (D1 Low EEO, Pronadisa™) al 0,8% (p/v)

preparados en tampón Tris-Acetato-EDTA [TAE, (Tris-base 40 mM, ácido acético glacial 0,12% (v/v), EDTA-Na₂ 2 mM)]. Los fragmentos de ADN menores de 500 pb se separaron en geles de agarosa al 2% (p/v). La separación se realizó por electroforesis horizontal con tampón TAE a un voltaje de 10 V/cm. Como tampón de carga se utilizó una solución 6x (1 µl por cada 5 de muestra) de glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol, 0,25% (p/v) y xilencianol, 0,25% (p/v) preparado en agua destilada. Para visualizar el ADN los geles se tiñeron por inmersión en una solución de *GelRed* (Biotium, 100U/L) durante 20-30 minutos y se expusieron a luz ultravioleta en un transiluminador.

Esta técnica también se utilizó para verificar la integridad del ARN total extraído. El procedimiento fue el mismo que el descrito anteriormente para ADN con las variaciones siguientes: todo el material de electroforesis se limpió previamente con un papel empapado en SDS 10% (p/v), y se utilizó nuevo tampón de corrida TAE con SDS 0,01% (p/v) para cada electroforesis. Se utilizaron geles de agarosa al 1,4% (p/v) preparados en TAE. Como tampón de carga se utilizó una solución 6x (1 µl por cada 5 de muestra) de glicerol 30% (v/v); naranja G (Sigma), 0,25% (p/v); preparado en agua libre de RNasas y *GelRed* (Biotium) 0,2 % (v/v). Las muestras se incubaron durante 5 minutos a 65°C e inmediatamente después se colocaron en hielo durante 1 minuto antes de cargar el gel.

Para la visualización e impresión de los geles se ha utilizado una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter Vm509) y el programa *Quantity One* de Bio-Rad para grabar y procesar las imágenes.

5.7.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

Para técnicas que precisan una buena resolución de las bandas, se utilizó la electroforesis vertical en geles de poliacrilamida desnaturalizantes por la adición de urea 7 M. La separación de las cadenas de ADN marcadas radiactivamente se realizó por electroforesis en un gel de secuenciación desnaturalizante (urea 7 M) con poliacrilamida al 6,5% (p/v) preparado en tampón Tris-Borato-EDTA [TBE, (Tris 50 mM, EDTA-Na₂ 2,5 mM, BO₃H₂ 50 mM, pH 8,2)] según Sambrook *et al.* (1989). A 60 ml de solución de poliacrilamida desnaturalizante (80 ml de TBE 5x; 86,6 ml de solución 30% de acrilamida-bisacrilamida 29:1(Bio-Rad); 168 g de urea; y H₂O_d hasta 0,4 L), se añadieron 250 µl de persulfato amónico 10% (p/v) y 75 µl de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) para catalizar la polimerización de la acrilamida. El montaje de las placas de cristal de la unidad de electroforesis se realizó conforme a las instrucciones del fabricante y una de ellas se trató con dimetildiclorosilano para evitar la adhesión del gel a la misma. Antes de cargar las muestras, el gel se corrió previamente a potencia fija de 40 W durante 45 minutos o hasta adquirir una temperatura de aproximadamente 50°C.

Durante la pre-corrída del gel se prepararon las muestras, ya que es importante que estén desnaturalizadas antes de cargarlas.

A las muestras resuspendidas en TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) se le añadieron 2 μ l de tampón de carga desnaturalizante (0,3% (p/v) azul de bromofenol; 0,3% (p/v) xilencianol; 10 mM EDTA, pH 8,0; 97% (p/v) formamida desionizada), se desnaturalizaron mediante calentamiento a 95°C durante 5 minutos y posteriormente se enfriaron en hielo.

La electroforesis se realizó en tampón TBE a potencia fija de 40 W (\approx 1.700 V) durante 2 horas aproximadamente. Tras la electroforesis, el gel se transfirió a un papel de filtro Whatman 3MM por adhesión, se cubrió con una película de plástico transparente y se secó al vacío a 80°C durante 20 minutos utilizando el sistema Gel Dryer 583 (Bio-Rad). Las bandas de ADN se visualizaron por exposición en pantallas BAS-IP MS2040 (Fuji) utilizando un equipo *Phosphor Imager Personal FX* (Bio-Rad). La cuantificación de la intensidad de las bandas analizadas se realizó con el programa informático *Quantity One* (Bio-Rad) suministrado con el equipo.

5.7.3. Marcadores de peso molecular

El tamaño de los fragmentos de ADN se estimó por comparación con diferentes marcadores de peso molecular comerciales:

- Marcador II: ADN del fago λ digerido con la enzima *HindIII*. Se compone de 8 fragmentos que abarcan desde los cientos de nucleótidos hasta más de 20 Kb. También se dispone marcado con digoxigenina que marcan el peso molecular en las hibridaciones ADN-ADN.
- Marcador VIII (Roche): ADN del plásmido pUCBM21 digerido con las enzimas de restricción *HpaII* y *DraI* más *HindIII*. Se compone de 18 fragmentos en un rango de 19 a 114 pb.
- Marcador X (Roche): Es una mezcla que contiene un fragmento de 1.018 pb derivado del plásmido 2 μ *Saccharomyces cerevisiae*, los multímeros de este fragmento y productos de restricción del plásmido pBR322.

5.8. Hibridación ADN-ADN (*Southern Blot*)

5.8.1. Transferencia alcalina por capilaridad

La transferencia de ADN por capilaridad a una membrana de nylon cargada positivamente se realizó siguiendo el protocolo de transferencia alcalina descrito por Sambrook *et al.* (1989) con algunas modificaciones. Para ello, el ADN previamente digerido se separó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (p/v). Una vez fotografiado el gel y establecidas sus dimensiones, el gel se sumergió en una

solución de HCl 0,2 N durante 15 minutos hasta que se produjo el viraje del azul de bromofenol a amarillo. Este tratamiento ácido permite introducir mellas en el ADN y depurarlo, lo que facilita la transferencia. La desnaturalización alcalina del ADN se realizó sumergiendo el gel en una solución de NaCl 1,5 M/NaOH 2 M durante 20 minutos. Pasado este tiempo se renovó la solución y se dejó durante 15 minutos más. Posteriormente, el gel se lavó con agua destilada. Para neutralizar el ADN, el gel se sumergió en una solución Tris-HCl 1 M/NaCl 1,5 M (pH 7,4) durante 15 minutos dos veces. Pasado ese tiempo, se retiró la solución y se lavó el gel con agua destilada. Antes de realizar la transferencia, se humedeció una membrana de nylon cargada positivamente (Roche) durante al menos 5 minutos en SSC 10x (preparado a partir de una solución de SSC 20x: 175,3 g de NaCl; 88,2 g de citrato sódico; 800 ml de H₂O; ajustar el pH a 7,0 y completar hasta 1 litro con agua destilada).

Sobre un cristal, se construyó una unidad de transferencia compuesta, de abajo hacia arriba, por: una pieza de papel Whatman 3MM cuyos extremos quedaban sumergidos en la solución de transferencia SSC 10x colocada en el reservorio inferior, seguida por el gel colocado en posición invertida, la membrana de nylon, tres piezas de papel Whatman 3MM y sobre estas, varias capas de papel de filtro que hacen de absorbentes. Se cubrió con otro cristal y por último un peso de aproximadamente 0,5 Kg comprobando que el sistema estuviese perfectamente horizontal, para dejar la transferencia durante toda la noche. De esta forma la solución de transferencia ascendió por capilaridad a través del gel arrastrando el ADN hasta la membrana, donde quedó retenido. Finalizada la transferencia, se lavó la membrana con SSC 2x durante 5 minutos y se secó a temperatura ambiente sobre papel de filtro durante 10 minutos.

Por último, el ADN se fijó a la membrana de nylon exponiéndola durante 3 minutos a una lámpara de luz UV (260 nm). Las membranas se conservaron secas a temperatura ambiente selladas en bolsa de plástico hasta su utilización.

5.8.2. Marcaje de la sonda

En este tipo de experimentos el marcaje se lleva a cabo con digoxigenina acoplada a un dNTP, en este caso dUTP. El marcaje de la sonda con digoxigenina y la detección de los híbridos ADN-ADN se realizó utilizando el sistema comercial *DIG DNA Labelling and Detection Kit* (Roche). Las sondas de ADN se sintetizaron por PCR (ver apartado 5.5) utilizando una mezcla de dNTPs que contiene DIG-11-dUTP (Roche), lo que produce una incorporación múltiple de dUTP marcado, ya que puede ser usado como sustrato por la Taq-polimerasa, reemplazando al dTTP durante la reacción en cadena de la polimerasa. Como ADN molde se utilizaron los plásmidos pPVG-A y pPVG-R con los genes de los que se obtuvieron las sondas. La mezcla de reacción era la estándar para una PCR (5.5) en un volumen

final de 50 µl con la diferencia de que la mezcla de dNTPs contenía 0,2 mM de dATP, dCTP y dGTP; 0,18 mM de dTTP y 0,02 mM de DIG-dUTP. Para la amplificación se usó el programa descrito en el apartado 5.5 ajustando la temperatura de hibridación según los cebadores utilizados. En paralelo, se realizaron controles utilizando dNTPs sin DIG-dUTP para comprobar el retraso en la migración en gel de agarosa, como consecuencia de la incorporación del nucleótido marcado.

La sonda marcada se diluyó en solución de hibridación [SSC 5x; N-lauril-sarcosina 0,05 mg/ml; SDS 0,02% (p/v); y agente bloqueante (Roche) 0,5% (p/v)], de 5 a 10 ml son suficientes para cubrir completamente la membrana. Las sondas preparadas en solución de hibridación se conservaron a -20°C, pudiendo ser reutilizadas posteriormente.

5.8.3. Hibridación y lavados

El proceso de hibridación utilizando ADN homólogo como sonda se efectuó utilizando un horno de hibridación (Hybridisation oven/shaker SI 20H). La prehibridación de la membrana se realizó durante 1 hora a 65°C en 20 ml de solución de hibridación (por 100 cm² de membrana). Entretanto, se desnaturalizó la sonda (diluída según el apartado anterior) mediante ebullición durante 10 minutos y posterior paso a hielo (5-10 minutos). Transcurrido el tiempo de la prehibridación, se eliminó de la membrana la solución de hibridación y se le añadió la sonda marcada y desnaturalizada, dejando incubar durante toda la noche a 65°C. Tras la hibridación, se recuperó la sonda y se almacenó a -20°C.

El lavado de la membrana se realizó en las siguientes condiciones de fuerza iónica y temperatura: dos lavados de 5 minutos en SSC 2x; SDS 0,1% (p/v) a temperatura ambiente, seguido de dos lavados de 15 minutos en SSC 0,1x y SDS 0,1% (p/v) a 65°C. Los lavados permiten retirar la sonda hibridada inespecíficamente.

5.8.4. Detección inmunológica

Esta reacción se realizó con el sistema *Detection Kit* (Roche), siguiendo el protocolo detallado por el fabricante con leves modificaciones. La detección de la sonda se basa en el uso de anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con la enzima fosfatasa alcalina. Esta enzima provoca la defosforilación del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) para dar lugar a un producto de color azul oscuro. La sal de azul de nitrotetrazolio (NBT) actúa como oxidante y también genera un color azul oscuro, de modo que se intensifica el color al producirse un precipitado azul insoluble, lo que hace que la detección sea más sensible.

La membrana se lavó 1 minuto con tampón I (Tris-HCl 100 mM, pH 7,0; NaCl 150 mM), y se bloqueó incubando en tampón II [tampón I suplementado con agente bloqueante (Roche) 0,5% (p/v)]

durante 30 minutos para evitar la unión específica de los anticuerpos anti-digoxigenina a la membrana. Pasado este tiempo, la membrana se lavó con tampón I durante un minuto y se incubó con 20 ml de tampón de anticuerpo (anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) diluïdos en tampón I a una concentración final de 150 mU/ml) durante 30 minutos. El exceso de anticuerpo no unido a la sonda se eliminó mediante dos lavados de 15 minutos con tampón I. A continuación, la membrana se equilibró con 20 ml de tampón III (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM; MgCl₂ 50 mM.) durante dos minutos y finalmente se incubó con 15 ml de tampón de revelado (67,5 µl de solución NBT y 52,5 µl de solución de BCIP disueltos en 15 ml de Tampón III) en una cubeta metálica y protegida de la luz, hasta la aparición de bandas. La reacción se detuvo lavando con agua destilada, la membrana se dejó secar a temperatura ambiente sobre papel de filtro y se guardó protegida de la luz.

6. Técnicas de manipulación de ARN

La purificación y manipulación de ARN requiere de material y reactivos libres de ribonucleasas, por lo que en la preparación de los reactivos y soluciones se utilizó siempre H₂O_d tratada con dietilpírocarbonato (DEPC). Para ello, a 1 litro de H₂O_d se añadió 0,1% (v/v) de DEPC y se dejó en agitación durante 1 hora. Posteriormente, se esterilizó en autoclave a 120°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

6.1. Aislamiento de ARN

Con objeto de paralizar lo más rápidamente posible el metabolismo bacteriano, las muestras se recogieron y centrifugaron muy rápidamente. A partir de un cultivo crecido en LB o MMF a la densidad óptica y condiciones de interés, se tomaron alícuotas de 10 ml para DO₆₆₀ = 0,5 y de 1,5 ml para DO₆₆₀ = 1,5 en tubos previamente enfriados en nitrógeno líquido. A continuación, se centrifugaron a 16.000 g durante 3 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y el sedimento celular se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Las células se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para el aislamiento de ARN total de Pto DC3000 y sus mutantes se empleó el reactivo TRI Reagent LS (Molecular Research Center, Inc). Las células almacenadas a -80°C se sacaron en hielo, a cada tubo se le añadió 1,5 ml de la solución TRI Reagent precalentada a 70°C, se resuspendieron por pipeteo y los tubos se incubaron durante 10 minutos a 65°C. Pasado este tiempo se centrifugaron (12.000 g, 10 minutos, 4°C) y los sobrenadantes se recuperaron en tubos nuevos, a los que se añadieron 0,1 volúmenes de BCP (1-bromo-3-cloropropano) y se mezclaron agitándolos vigorosamente durante 30 segundos. Los tubos se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente para que se

separaran las fases. Se centrifugaron nuevamente (16.000 g, 15 minutos, 4°C), la fase superior acuosa se transfirió a un tubo nuevo y el ARN se precipitó añadiendo un volumen de isopropanol. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugaron de nuevo (12.000 g, 8 minutos, 4°C). Tras descartar el sobrenadante, las muestras se lavaron con 1 ml de etanol 70% (v/v) en H₂O DEPC y se centrifugaron (12.000 g, 5 minutos, 4°C). Tras eliminar el sobrenadante y dejar los tubos abiertos secando a 30-37°C durante 15 minutos, el precipitado se resuspendió en 80 µl de H₂O tratada con DEPC a 50°C durante 5-10 minutos. Finalmente, el ARN se almacenó directamente a -80°C o se realizó el tratamiento con DNasa I.

6.2. Tratamiento con DNasa I

Para eliminar los restos de ADN contaminante en las preparaciones de ARN, las muestras se trataron con DNasa I libre de RNAsas (Qiagen). A 80 µl de ARN se añadieron 14 µl de tampón 10xRDD y 6 µl de DNasa I (1500 Unidades Kunitz) en un volumen final de 140 µl. Se digirió durante una hora a 28°C (la incubación podría alargarse media hora más).

Tras el tratamiento con DNasa, las muestras se limpiaron con el sistema comercial *RNeasy Kit* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La elución se realizó dos veces, añadiendo 35 µl de H₂O libre de RNAsas (Qiagen), incubando durante 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugando a velocidad máxima 1 minuto. Las muestras se cuantificaron y almacenaron a -80°C en caso de no seguir con la síntesis de ADN (ADNc).

6.3. Determinación de la integridad y concentración del ARN total

La integridad del ARN total extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,4% (p/v) (apartado 5.7.1). La concentración de ARN y la pureza de la extracción (contaminación de proteínas y/o fenol) se midieron de manera equivalente al ADN (previa dilución en H₂O DEPC) en el Nanodrop ND-1000 (Bio-Rad) utilizando el factor para ARN, ya que la concentración se calcula a partir de la DO₂₆₀ (1 unidad de DO₂₆₀ = 40 µg/ml de ARN). La relación DO 260 nm / DO 280 nm se usó como estimador de la pureza de la preparación, considerándose valores por debajo de 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol.

6.4. Extensión reversa a partir de un cebador (*primer extension*)

Esta técnica se emplea de forma rutinaria para detectar sitios de inicios de transcripción y consiste en mezclar un ARNm problema con un exceso de oligonucleótido complementario a una región cercana al supuesto extremo 5' o a aproximadamente 50 pb por debajo del primer ATG del ORF. Este

oligonucleótido marcado radiactivamente será utilizado como cebador por una reverso transcriptasa producirá un ADNc cuya longitud debe permitir la localización del extremo de la molécula de ARNm.

6.4.1. Marcaje de cebadores

El marcaje de los oligonucleótidos se realizó por fosforilación en su extremo 5'. La reacción, catalizada por la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 (PNK, Roche), permite la incorporación de un fosfato marcado radiactivamente situado en posición γ de una molécula de ATP, al extremo 5'-OH del cebador. Se marcaron entre 10-20 pmoles de oligonucleótido en un volumen final de 10 μ l de tampón de fosforilación (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; MgCl₂ 10 mM; DTT 5 mM; EDTA 0,1 mM; espermidina 0,1 mM), 1 μ l de [γ -³²P] ATP (6000 mCi/mmol) y 1 U de PNK. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, la enzima se inactivó durante 10 minutos a 70°C y se añadieron 10 μ l de H₂O DEPC antes de pasar el volumen resultante por una columna *Micro Bio-Spin 6* (Bio-Rad) para eliminar el exceso de ATP radiactivo. El marcaje del oligonucleótido marcado se cuantificó utilizando un contador de centelleo TRI-CARB 1500 *Liquid Scintillation Analyzer* (Packard).

6.4.2. Hibridación y extensión reversa a partir de cebador

Como cebadores complementarios a las cadenas de ARNm se utilizaron los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 9. Los cebadores hibridan con secuencias próximas al extremo 5' de los genes en estudio.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de extensión

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Características
PEmexA1	GAACGGTAACAGCTGGCTTG	Hibrida en la secuencia codificante de <i>mexA</i> a 5 nucleótidos del ATG
PEpmeR_IR	ATGCATCTGGTGCATGCC	Hibrida dentro de la región líder del ARNm del gen <i>pmeR</i>

Para la hibridación se mezclaron 20 μ g (para *mexAB-oprM*) y 30 μ g (para *pmeR*) de ARN total, 1,5 μ l del cebador marcado (~200.000 cpm), 2 μ l de tampón de hibridación 5x (Tris-HCl 1M, pH 7,6; MgCl₂ 100mM; DTT 160 mM) y H₂O DEPC hasta 10 μ l. La mezcla se incubó 5 minutos a 90°C para la destrucción de posibles estructuras secundarias, 5 minutos a 65°C para la hibridación y se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar 44°C para el cebador de *mexA* y 58°C para el cebador de *pmeR*.

La extensión usando el cebador PEmexA1 se inició añadiendo 40 μ l de una mezcla de extensión que contenía 1 mM de cada uno de los cuatro dNTPs, 20 U de inhibidor de RNasas (Roche) y 8 U de

transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV, Roche) en tampón de extensión (Tris-HCl 50 mM pH 8,5; MgCl₂ 8 mM; KCl 30 mM; DTT 1 mM). En el caso del cebador PEpmeR_IR, la extensión se inició igualmente añadiendo 40 µl de mezcla de extensión que contenía 1 mM de dNTPs, 20 U de inhibidor de RNasas (Roche) y 8 U de transcriptasa reversa SuperScript III RT (Invitrogen) en tampón de extensión (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3 KCl 75 mM DTT 3 mM). Las reacciones se incubaron 1 hora a 44°C (para *mexA*) y a 58°C (para *pmeR*), y se detuvieron añadiendo 5 µl de acetato sódico 3 M (pH 4,8) y 150 µl de etanol absoluto frío. Los ácidos nucleicos se precipitaron a -20°C, se centrifugaron 15 minutos a 12.000 g y el sedimento se lavó con etanol 70% (v/v) frío. Una vez seco, el sedimento se resuspendió en 4 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) y 2 µl de tampón de carga (0,3% (p/v) azul de bromofenol; 0,3% (p/v) xilencianol; 10 mM EDTA; 97,5% (p/v) formamida desionizada). Para analizarlas por electroforesis, las muestras se desnaturalizaron y se cargaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (apartado 5.7.2).

6.5. Reacción de amplificación en cadena con ADN polimerasa termorresistente acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-PCR)

La transcripción reversa y la posterior reacción de amplificación del ADNc se realizaron utilizando el sistema comercial *Titan One Tube RT-PCR System* (Roche) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La transcripción reversa se realizó incubando las muestras a 50°C durante 30 minutos. Posteriormente, se amplificaron mediante una reacción de PCR en las siguientes condiciones: tras una incubación de 4 min a 95°C, se realizaron 30 ciclos (20 segundos a 95°C, 20 segundos a 57°C, 35 segundos a 68°C), para finalmente extender a 65°C durante 7 minutos. En todos los ensayos se llevaron a cabo controles negativos para detectar posibles falsos positivos en la reacción de extensión debido a la presencia de ADN en las muestras de ARN. Dicho control negativo consistía en una reacción de amplificación en ausencia de transcriptasa reversa, es decir, únicamente en presencia de Taq polimerasa. Las secuencias de los cebadores utilizados en estos ensayos para el análisis de los genes *mexAB-oprM* se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Característica
RT2mAB+	TCACCGAAGGTCTGCAATAC (F)	Hibrida 128 nt antes del codón de parada de <i>mexA</i>
RTmAB-	TTCGAGACGATGTAGTTGG (R)	Hibrida 482 nt después del codón de inicio de <i>mexB</i>
RTmBM+	CGATCGGTACAGGCGTAATTG (F)	Hibrida 140 nt antes del codón de parada de <i>mexB</i>
RTmBM-	AGGTCACGGTTGTTGAGCAG (R)	Hibrida 236 nt después del codón de inicio de <i>oprM</i>

6.6. Cuantificación de la expresión génica por medio de amplificación en cadena a tiempo real (qRT-PCR)

6.6.1. Diseño de los oligonucleótidos

Las secuencias de los genes para el diseño de los cebadores específicos para cada transcrito se obtuvieron en (www.pseudomonas-syringae.org/pst_home.html). El diseño de los oligonucleótidos se realizó con el programa Oligo 6.1.1/98 (Molecular Biology Insights) siguiendo las recomendaciones descritas en Pueyo *et al.* (2002). Como características generales, los cebadores se diseñaron para amplificar un producto de entre 100 y 200 pb, evitando la formación de estructuras secundarias y amplificaciones inespecíficas. Los cebadores seleccionados tenían valores de T_m altos (≥ 80 °C y con diferencias menores a 1°C entre los miembros de una misma pareja) y valores óptimos de $3'\Delta G$ (≥ -8 kcal/mol).

6.6.2. Síntesis de ADNc a partir de ARN

La síntesis de la hebra complementaria de ADN (ADNc) a partir de las muestras de ARN se realizó con la enzima transcriptasa reversa de Invitrogen SuperScript™ II RT siguiendo las instrucciones del fabricante.

La mezcla de reacción inicial contenía 1 µg de ARN total, 100 ng de hexámeros aleatorios (Roche), 0,5 mM de cada uno de los dNTPs y agua milliQ estéril (hasta 10 µl). Esta mezcla se incubó 5 minutos a 65°C, 10 minutos a temperatura ambiente y 1 minuto en hielo. Posteriormente a temperatura ambiente, se añadieron 10 µl de una mezcla de extensión que contenía 4 U/µl de inhibidor de RNasa, 10 mM de DTT y 24 U/µl de enzima SuperScript™ II RT en tampón de extensión (Tris-HCl 50 mM, pH 8,3; KCl 75 mM; MgCl₂ 3 mM). La mezcla se incubó a 25°C durante 10 minutos, para luego realizar la reacción de transcripción reversa a 42°C durante 2 horas. Al finalizar, la enzima se inactivó por calentamiento a 70°C durante 15 minutos.

6.6.3. Reacción de amplificación para la cuantificación de la expresión génica relativa (qRT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es un método que permite la cuantificación de ácidos nucleicos con gran exactitud y fiabilidad. Está basada en la monitorización de la PCR usando fluorescencia, lo que permite la visualización en directo del perfil completo de amplificación de los genes diana. El número de copias del ADN molde al inicio de la reacción se puede cuantificar con precisión a través del ciclo umbral (Ct). El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca

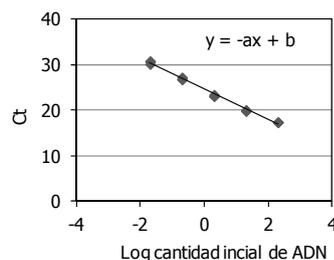
un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde. De esta manera, es posible comparar las muestras y determinar la cantidad de transcrito bajo las condiciones de interés.

La amplificación de los fragmentos de ADNc para la cuantificación de los niveles de transcritos iniciales se realizó en un termociclador iCycler iQ2 de Bio-Rad y en un volumen final de 25 μ l que contenía: ADNc (50 ng), oligonucleótidos específicos para cada gen (300 nM) y una mezcla que viene comercialmente preparada 2x iQ SYBR™ Green Supermix que contiene dNTPs, MgCl₂, SYBR Green I, fluoresceína y ADN polimerasa iTaq. Las condiciones estándar de la reacción de amplificación fueron las siguientes: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos, 40 ciclos de dos pasos cada uno [desnaturalización (95°C, 20 segundos) y apareamiento de los cebadores y extensión (70°C, 30 segundos)]. Tras la amplificación, las condiciones para obtener la curva de fusión o curvas de *melting* fueron 95°C durante 1 minuto, seguido por 30 ciclos de 10 segundos, iniciando a 95°C y disminuyendo 1°C por ciclo hasta 66°C.

6.6.4. Determinación de la eficiencia de los cebadores

La eficiencia de las amplificaciones obtenidas mediante PCR en tiempo real a partir de cada pareja de cebadores puede calcularse realizando una curva patrón. Dicha curva se obtiene representando el logaritmo del número inicial de moléculas frente al número mínimo de ciclos de PCR necesarios para observar amplificación partiendo de esa cantidad de transcrito (ciclo umbral, Ct). En nuestro caso, cuantificando el ARN inicial y suponiendo una eficiencia del 100% en la síntesis del ADNc se realizaron diluciones seriadas entre 200 ng y 0,02 ng de muestra por reacción. De esta manera se correlacionó la cantidad inicial de transcrito y el Ct obtenido para cada dilución.

Durante la fase exponencial de la PCR en tiempo real la cantidad de producto de PCR se duplica en cada ciclo. Por ello, la diferencia entre los valores de Ct de cada dilución está determinada por la ecuación $2^n = \text{factor de dilución}$, donde n es el número de ciclos de diferencia. Si el factor de dilución es 10, entonces $n=3,32$ y los valores de Ct deberían estar separados cada 3,32 ciclos. La eficiencia de la amplificación E, se calcula a partir de la pendiente de la curva patrón utilizando la fórmula:



$$E = 10^{-1/a} - 1$$

E = eficiencia de los oligonucleótidos
a = pendiente de la recta de la regresión

Si la cantidad de producto de PCR se duplica exactamente en cada ciclo, E es igual a 1.

6.6.5. Determinación de productos inespecíficos y estructuras secundarias mediante el análisis de la curva de fusión o curva de *melting*

Después de cada reacción de PCR cuantitativa se analizó la curva de fusión o de *melting*. Esta curva se produce como consecuencia del descenso de la señal fluorescente del producto de PCR formado debido a la fusión dependiente de temperatura del producto amplificado y se obtiene mediante la relación entre la derivada de la fluorescencia y la temperatura. La derivada revela un pico máximo correspondiente a la temperatura de fusión del producto (T_m). Los productos específicos de una pareja de cebadores deben presentar el pico máximo de la curva de fusión a la misma temperatura. Si se produce una amplificación inespecífica, este pico estaría desplazado respecto al obtenido a partir del producto específico. Si se amplifica más de un fragmento a partir de una pareja de cebadores, la curva presentaría picos múltiples a temperaturas diferentes. Para nuestro análisis sólo se consideraron las muestras cuyos productos presentaban curvas de fusión homólogas.

6.6.6. Cálculo de la expresión relativa

El cálculo de la expresión relativa a partir de los datos de la PCR en tiempo real se hizo mediante el método $\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001). Tras la transcripción reversa se amplificaron por PCR cuantitativa los transcritos correspondientes al gen de estudio y al gen de referencia utilizando sus respectivas parejas de cebadores específicos. En nuestro caso, utilizamos como gen de referencia *gyrA*, que codifica para la subunidad A de la ADN girasa, ya que no modificaba su expresión en los tratamientos con floretina. La expresión de cada gen relativa a *gyrA* se calculó a partir de la diferencia entre las C_t s obtenidas con sus cebadores respectivos ($\Delta Ct = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{gyrA}}$) en la misma muestra de ADNc. La expresión de cada gen comparado con el tratamiento control ($\Delta\Delta Ct$) se determinó a partir de la diferencia entre los ΔCt s obtenidos con los mismos cebadores y sus correspondientes muestras de ADNc. Dado que un ciclo de PCR representa una diferencia de dos veces en la abundancia del templado y por lo tanto del número de transcritos iniciales, los valores de inducción se calcularon como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

6.6.7. Cebadores utilizados para PCR cuantitativa

Se muestran en tabla 11 las secuencias de los cebadores empleados para la amplificación y cuantificación de los genes de interés, que se diseñaron teniendo en cuenta las pautas descritas en la sección 6.6.1.

Tabla 11. Cebadores utilizados para la cuantificación de los transcritos

Gen	Producto (pb)	Secuencia (5' → 3')	Ecuación curva de eficiencia (coeficiente de correlación)	Eficiencia
<i>aer-2</i>	98	CGAACAGACCACCTCCGACCCGTTG (F) GCGCTTGCTGGCTGAGGATCGACA (R)	$y=-3,321x+27,343$ (0,99)	1,00
<i>cheA2</i>	189	GGCAAGGTGATTCTTTCGGCAGAGCAG (F) CGAGAAGCCCGGTGCAAAGATCAGG (R)	$y=-3,327x+23,556$ (0,99)	0,99
<i>fleQ</i>	134	GCGAGAGGTTCTGTGCGTGCTGGTC (F) GCAGCTCGACGGAAGAGTTTTCGCTCA (R)	$y=-3,311x+36,286$ (0,98)	1,00
<i>fleS</i>	154	CGCCAGTCATCTGACCGAGCAGGAA (F) GGGCGTTAGGCGGTCCGTCAGC (R)	$y=-3,325x+37,393$ (0,99)	1,00
<i>flgF</i>	194	TCGACCAATGGCTTCATGCGTGACCTT (F) TCGGGAGTCTGCACGCAATCCAG (R)	$y=-3,330x+36,873$ (0,99)	1,00
<i>fliA</i>	106	CGAGGACGGCGCAAGCGGTTT (F) ACGCTCGCGCTCTGGCAAATTGG (R)	$y=-3,295x+34,897$ (1,00)	1,01
<i>fliC</i>	197	AAGGCGCACTGCAAGAGTCGACCAAC (F) GGTGCTGGCGGAACCGTCAAGC (R)	$y=-3,315x+37,554$ (0,98)	1,00
<i>gyrA</i>	205	GGCAAGGTCACCCGCTTCAAGGAAT (F) GACCGCCACGCTTGTACTCAGGGAAC (R)	$y=-3,329x+24,675$ (0,99)	1,00
<i>hrpL</i>	138	CAAACCGCAGACCTGGCTGTGTGG (F) TGACTGACATCACCGTGCCCTTCCA (R)	$y=-3,327x+26,951$ (0,99)	1,00
<i>hrpR</i>	154	TCCGAGAGTGTTGGGGCGTAAGTGCAT (F) CCCGACCTGCTGGACAACCTCGTGA (R)	$y=-3,325x+29,078$ (0,99)	1,00
<i>mexA</i>	155	CAGGACGACCGCTTCCGTTGTGG (F) CTTGCCACTGTTGGCGTTGGCTTC (R)	$y=-3,289x+24,349$ (0,99)	1,01
<i>pmeR</i>	116	TCGCACCAAAGAGGAAGCTCAGATCACC (F) CGGCAAGGGTCGCAATGTCAGC (R)	$y=-3,302x+22,374$ (0,99)	1,00
<i>rpoN</i>	168	CAGCGCCGACAACACCTTCATGC (F) TGCAGGACGAGCGGCTTCATG (R)	$y=-3,301x+22,505$ (0,99)	1,00
<i>rsmY</i>	91	GCGCAACAAGACATAACAGGGACACG (F) AGCGGGCTTCCAGACTGTTTCC (R)	$y=-3,331x+17,556$ (0,99)	0,99
<i>rsmZ</i>	94	CAGGCCATCAAGGATGACGGTCAGG (F) CCGCCACATTTTGTCTTAATCCCTGT (R)	$y=-3,338x+17,451$ (0,99)	0,99

7. Purificación y análisis de proteínas

7.1. Obtención de proteína total

El análisis de las proteínas FliA y FliC en extractos de proteína total se realizó en dos condiciones de cultivo: en medio rico LB y en medio mínimo inductor MMF. A partir de placas frescas, se colocaron preinóculos de las cepas de interés en 10 mL de LB suplementado con los antibióticos adecuados a 28°C y con agitación continua durante 12 horas. Para los cultivos en LB, las células se diluyeron a una DO₆₆₀ inicial de 0,05 en 25 ml de LB sin y con floretina (0,3 mM para todas las cepas y 0,05 mM para

DC3000A) y se incubaron en agitación a 25°C hasta alcanzar una DO_{660} de 0,5, momento en el cual se recogieron las células mediante centrifugación de 10 ml de cultivo a 2.500 g durante 10 minutos a 4°C. Para los cultivos en MMF, tras alcanzar la DO_{660} de 0,5 en LB, las células se recogieron por centrifugación a 4.000 g durante 8 minutos, se lavaron dos veces con MMF y se ajustó la densidad celular a $DO_{660} = 0,5$; posteriormente se dispusieron dos cultivos con al menos 10 ml en MMF sin y con floretina 0,15 mM, que se incubaron en agitación a 25 °C durante 3 horas, tras lo cual las células se recogieron centrifugando 10 ml de cultivo a 2.500 g durante 10 minutos a 4°C. El sedimento celular resultante en cada caso, se resuspendió en tampón fosfato [PBS, (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,8 mM; Na_2HPO_4 10 mM; pH ajustado a 7,4)] suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Complete-EDTA free, Roche). A continuación, las células se lisaron adicionando 10 μ l de lisozima (4 mg/ml) dejando actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente, seguido de lisis mediante sonicación utilizando un sonicador Branson Sonifer 250, aplicando tres ciclos de sonicado de 10 segundos cada uno, con un intervalo de 1 minuto entre ciclos. Los extractos de proteína total se recuperaron del sobrenadante tras centrifugar el lisado a 15.000 g durante 2 minutos a 4°C, las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

7.2. Sobreexpresión de proteínas

La sobreexpresión de la proteína PmeR nativa se realizó en la cepa *E. coli* B834 (DE3). Las células de *E. coli* transformadas con el plásmido pPV3 se cultivaron a 30°C en medio rico 2xYT suplementado con 25 μ g/ml de kanamicina hasta una DO_{660} entre 0,5 y 0,6. Entonces se indujo la expresión de la proteína añadiendo al medio 1 mM del inductor IPTG. Tras 3 horas de inducción a 18°C, se recogieron las células por centrifugación a 10.000 g y a 4°C. El sedimento celular se resuspendió en 30 ml de tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 6,4; NaCl 20 mM; glicerol 5% (v/v); EDTA 0.1 mM) suplementado con una pastilla de cóctel de inhibidores de proteasas *Complete* (Roche) y lisozima (20 μ g/ml). Tras mantener el sedimento celular en hielo durante 30 minutos, las células se rompieron en la prensa francesa a una presión de 10.000 psi. El lisado se centrifugó a 13.000 g durante 1 hora a 4°C y se recuperó la fracción soluble, constituida por el sobrenadante. Con el fin de comprobar la sobreexpresión de PmeR en la fracción soluble, se tomaron alícuotas del cultivo antes y después de la inducción y se hizo el análisis del perfil de proteínas mediante electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, apartado 7.4.2.)

7.3. Cromatografía de proteínas

La cromatografía de proteínas se llevó a cabo en un equipo FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÄKTA (GE Healthcare) dotado de un colector de fracciones automático.

7.3.1. Cromatografía de afinidad en columna de heparina

El primer paso en la purificación de la proteína nativa PmeR se llevó a cabo utilizando una columna de heparina *HiTrap Heparin HP* de 5 ml (GE Healthcare), que permite la retención de proteínas que se unen al ADN debido al establecimiento de interacciones electrostáticas entre la heparina y los residuos básicos normalmente presentes en los dominios de unión al ADN de dichas proteínas. La columna se lavó previamente según las instrucciones del fabricante y se equilibró con tampón A. Para el gradiente de elución, se utilizó el tampón B (tampón A con 0,6 M de NaCl). Tras cargar en la columna la fracción soluble obtenida (apartado 7.2), la columna se lavó con el tampón A para eliminar las proteínas no retenidas. Posteriormente, se eluyeron las proteínas retenidas aplicando un gradiente lineal de NaCl (de 0,02 a 0,5 M de NaCl en 25 volúmenes de columna) y se recogieron fracciones entre 1,5 y 5 ml cuyo contenido en proteína se analizó mediante *SDS-PAGE*. Las fracciones en las que la proteína PmeR era mayoritaria, se reunieron y el volumen resultante se concentró por ultrafiltración a través de una membrana-filtro con poro de exclusión de 10 kDa (Amicon Millipore). Para ello, se empleó un dispositivo de ultrafiltración modelo 8050 (Amicon Millipore) conectado a una fuente de gas N₂ comprimido según instrucciones del fabricante. Una vez alcanzado un volumen de aproximadamente 4 ml, la solución con la proteína se sometió a diálisis en tampón C (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 250 mM; glicerol 10% (v/v); EDTA 0,1 mM; DTT 1 mM) durante 12 horas a 4°C antes de proseguir con el siguiente paso de purificación.

7.3.2. Cromatografía de exclusión molecular preparativa

El segundo paso en la purificación de la proteína PmeR se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión molecular a través de una columna *Sephacryl S-200 HR* (GE Healthcare) que permite la separación de proteínas según su peso molecular y volumen globular. Esta columna permite la separación óptima de proteínas cuyo peso molecular está entre 5 kDa y 250 kDa.

La columna fue previamente lavada y equilibrada en tampón C a un flujo constante de 0,5 ml/minuto. Se inyectaron 8 ml de muestra (obtenidos tras la diálisis) y se recogieron fracciones de 1 ml. El contenido proteico de las fracciones se analizó mediante *SDS-PAGE*, tras lo cual se reunieron las fracciones que contenían la proteína PmeR con una pureza superior al 90% y se concentraron entre 3 y 5 veces por ultrafiltración (ver apartado anterior). Finalmente, la muestra de proteína pura se sometió a

diálisis en el tampón de almacenamiento (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; NaCl 250 mM; glicerol 10% (v/v); EDTA 0,1 mM; DTT 5 mM) durante 12 h a 4°C, se repartió en alícuotas de 0,2 ml y se almacenó a -80°C.

7.3.3. Cromatografía de exclusión molecular analítica

Con el fin de determinar el peso molecular aparente y estado de agregación de la proteína, se realizó una cromatografía de exclusión molecular empleando una columna *Superdex 200 10/300 GL* (GE Healthcare). La columna se lavó y equilibró con tampón de almacenamiento a un flujo constante de 0,5 ml/minuto. Para la curva patrón, se utilizó el producto comercial *Gel Filtration Molecular Weight Markers* (Sigma) que contiene β -amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa), albúmina de suero bovina (66 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y citocromo C oxidasa (12,4 kDa) preparado en tampón de almacenamiento a la concentración recomendada por el fabricante. Finalmente, 0,21 mg de PmeR purificada se cargaron en la columna y se determinó su volumen de elución. La masa molecular de PmeR se estimó a partir de una curva patrón que se obtuvo representando el logaritmo natural del peso molecular de las proteínas estándar con respecto su volumen de elución.

7.4. Electroforesis de proteínas

Para la separación electroforética de proteínas se utilizó el equipo de electroforesis vertical *Mini-PROTEAN II* (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7.4.1. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes

Las electroforesis se realizaron en geles de poliacrilamida 4,5% (p/v) de 1,0 mm de espesor preparados en tampón Tris-glicina (Tris-HCl 25 mM pH 8,0; glicina 200 mM). A 10 μ l de muestra de proteínas (o complejo proteína-ADN) se añadieron 2 μ l de tampón de carga no desnaturalizante (Tris-HCl 40 mM pH 8,0; glicerol 40% (p/v); NaCl 100 mM; azul de bromofenol 0,2% (p/v); EDTA 0,1 mM) y se cargaron en los geles. Las electroforesis se llevaron a cabo en el mismo tampón Tris-glicina a 50 V durante 2,5 h y a 4°C.

7.4.2. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (*SDS-PAGE*)

Las electroforesis se realizaron utilizando geles discontinuos de poliacrilamida de 0,75 o 1,0 mm de espesor de acuerdo con el método descrito por Laemmli (1970). Cada gel constó de un segmento superior concentrador [Tris-HCl 125 mM pH 6,8; poliacrilamida 4,5% (p/v); SDS 0,1% (p/v)] y un

segmento inferior separador [Tris-HCl 375 mM, pH 8,8; poliacrilamida 10% o 12% (p/v); SDS 0,1% (p/v)]. A 10 µl de muestra se añadió un volumen equivalente de tampón de carga para SDS-PAGE [Tris-HCl 100 mM pH 6,8; β-mercaptoetanol 10% (v/v); azul de bromofenol 0,2% (p/v); glicerol 20% (v/v); SDS 4% (p/v)]. Para las muestras de proteína total, a 12,5 µl de muestra se añadieron 2,5 µl de tampón de carga SDS [6x: Tris-HCl 350 mM pH 6,8; β-mercaptoetanol 20% (v/v); azul de bromofenol 0,2% (p/v); glicerol 30% (v/v); SDS 6% (p/v)]. En ambos casos las muestras se calentaron a 90°C durante 5 minutos. La electroforesis se llevó a cabo en tampón Laemmli [Tris-HCl 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM; SDS 0,1% (p/v)], a 90 V durante 1,5 horas.

7.5. Tinción de proteínas con azul de Coomassie

Las proteínas se visualizaron directamente en el gel mediante tinción con una solución de azul de Coomassie [0,25% (p/v) de azul de Coomassie en una mezcla de metanol: ácido acético: agua en proporción 45:10:45 (v/v/v)]. En lugar de las dos a cuatro horas necesarias por el método tradicional, la tinción se aceleró calentando en microondas el gel sumergido en la solución anterior justo hasta que comenzó a hervir. Entonces se transfirió a la solución destañadora (igual a la anterior pero sin azul de Coomassie), que se cambió frecuentemente por solución fresca hasta que las bandas de proteínas se visualizaron con nitidez.

7.6. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por espectrofotometría mediante el ensayo de Bradford (1976), utilizando el reactivo de Bradford comercial (Bio-Rad). En cada ensayo se realizó en paralelo una curva patrón con una solución fresca de albumina de suero bovino, siguiendo el protocolo *microassay* descrito en las instrucciones del fabricante.

Así mismo, la concentración de PmeR se cuantificó en el Nanodrop ND-1000 (Bio-Rad) a DO_{280} y utilizando los parámetros de peso molecular (25.534 Da) y el coeficiente de extinción (ϵ) a 280 nm ($17.085 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La concentración se determinó a partir de la siguiente fórmula: $M = DO_{280} / \epsilon$.

7.7. Western Blot

Tras separar mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) las proteínas totales obtenidas como se indica en el apartado 7.1 y cargando la misma cantidad para todas las muestras (0,5-1,5 µg de proteína total), las proteínas se transfirieron desde el gel a membranas de PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane IPVH 15150 de 0,45 µm de poro, Millipore). Para ello se utilizó el sistema de transferencia *Mini trans-blot electrophoretic transfer cell* de Bio-Rad y el tampón de

transferencia (Tris 0,025 mM; glicina 192 mM; metanol 20% (v/v); pH 8,5) durante 1 hora a 100 V y a 4°C. Al finalizar la transferencia, las membranas se lavaron 5 minutos con agua destilada. Para comprobar la completa transferencia de proteínas, las membranas se tiñeron con una solución de Rojo Ponceau [Ponceau S 0,2% (p/v), ácido tricloroacético 3% (p/v)] durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las bandas se visualizaron destiñendo con agua destilada, hasta alcanzar el contraste adecuado. La tinción fue totalmente eliminada con sucesivos lavados de agua destilada y con un lavado final de 5 minutos con PBS-T (tampón PBS suplementado con Tween 20 al 0,1 %) en agitación a temperatura ambiente.

Las membranas de PVDF con las proteínas transferidas, se sometieron al bloqueo de sitios inespecíficos de unión al anticuerpo mediante incubación con agitación suave a temperatura ambiente durante al menos 1 h, en tampón de bloqueo (leche desnatada en polvo al 2% (p/v) en PBS-T). A continuación, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario, ya sea anti-flagelina (De Weger *et al.*, 1987, proporcionado por el Dr. Rafael Rivilla) o el anticuerpo anti-FliA (Jyot *et al.*, 2007) diluidos 1:10.000 en tampón de bloqueo durante 12 horas a 4°C. Posteriormente, se recuperó la solución con el anticuerpo primario almacenándola a -20°C y se realizaron 2 lavados con PBS-T durante 5 minutos. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate, Bio-Rad ref. 170-6515) diluido 1:28.000 en tampón de bloqueo, incubando durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. El exceso de anticuerpo se eliminó con 5 lavados de 5 minutos cada uno en PBS. El revelado para la inmunodetección se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema *ECL Plus Western blotting detection reagents* (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las membranas se visualizaron utilizando el sistema de detección de quimioluminiscencia *ChemiDoc™ XRS* (Bio-Rad) y se analizaron con el programa informático *Quantity One* (Bio-Rad) suministrado con el equipo.

7.8. Ensayos de retardo en gel

El ensayo se basa en la diferencia de movilidad electroforética existente entre un fragmento de ADN libre y el complejo ADN-proteína ya que, en este último caso, la migración del ADN se ve retardada con respecto al ADN libre al unírsele una macromolécula globular de menor movilidad electroforética. En este procedimiento se utilizó un fragmento de ADN de 263 pb, que contiene la región intergénica *pmeR-mexA*, generado por PCR utilizando el par de cebadores PstI-PpmeR1 y PpmeR-EcoRI2 (Tabla 6). El fragmento amplificado de 263 pb se purificó de un gel de agarosa (5.6.1) y se marcó radiactivamente. Para el marcaje se utilizó el mismo método que para el marcaje de cebadores

(apartado 6.4.1): fosforilación con [γ ^{32}P] ATP (6000 mCi/mmol) con la enzima polinucleótido quinasa (PNK).

El ADN marcado (10.000 cpm, aproximadamente 1 nM) se incubó durante 10 minutos con diferentes concentraciones de proteína PmeR purificada (entre 5 nM y 100 nM) en 10 μl finales de tampón de unión (Tris-acetato 25 mM pH 8,0; acetato magnésico 8 mM; KCl 10 mM; polietilenglicol 8000 3,5% (p/v) y DTT 5 mM) suplementado con ADN (poli dl-dC, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y proteína (albúmina de suero bovina, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inespecíficos. Cuando se utilizaron efectores en los ensayos, estos se añadieron a la mezcla de unión a una concentración final de 1 mM. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 10 minutos, se les añadió 2 μl de tampón de carga no desnaturizante y se analizaron por electroforesis en geles de poli(acrilamida) al 4,5% (p/v) en condiciones no desnaturizantes (apartado 7.4.1) en tampón Tris-glicina durante 2,5 horas a 50 V y a 4°C. Los geles se secaron y se analizaron como se describe en el apartado 5.7.2, utilizando el equipo *Phosphor Imager Personal FX* (Bio-Rad) y el programa informático *Quantity One* (Bio-Rad).

7.9. Ensayos de impronta *in vitro* (footprint)

En todos los ensayos se empleó el mismo fragmento de ADN de 263 pb que contiene la región intergénica *pmeR-mexA*. Este fragmento se obtuvo por PCR utilizando por tanto los mismos cebadores PstI-PpmeR1 y PpmeR-EcoRI2, con la diferencia de que, en este caso, uno de ellos fue previamente marcado radiactivamente por fosforilación con PNK y [γ ^{32}P] ATP (ver apartado 6.4.1). Así, para analizar la cadena superior, se marcó únicamente el cebador PstI-PpmeR1, mientras que para analizar la cadena complementaria, se marcó el cebador PpmeR-EcoRI2.

Los ensayos de impronta que se realizaron con los fragmentos de ADN marcados se conocen como ensayos de protección, ya que en estos se incubaba el ADN con la proteína antes del tratamiento enzimático (DNasa I) o químico (dimetilsulfato) del ADN. Todas las mezclas ADN-proteína se hicieron en un volumen final de 10 μl de tampón de unión (Tris-acetato 25 mM pH 8,0; acetato magnésico 8 mM; KCl 10 mM; polietilenglicol 8000 3,5% (p/v) y DTT 5 mM) suplementado con poli (dl-dC) a 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y albúmina de suero bovina a 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Aproximadamente 20.000 cpm (~ 20 nM) del fragmento de ADN marcado y purificado se incubaron 10 minutos a 30°C en ausencia y en presencia de la proteína PmeR (0,5 μM y 1 μM). A continuación, la mezcla de unión se sometió al tratamiento químico o enzimático deseado (ver siguientes apartados), tras lo cual las muestras de ADN se precipitaron y se analizaron por electroforesis en gel desnaturizante de poli(acrilamida) al 6,5 % (p/v) (apartado 5.7.2) cargando el mismo número de cpm (5.000 – 6.000 cpm) en cada uno de los carriles del gel.

7.9.1. Footprint de protección contra DNasa I

A los 10 µl de mezcla de unión se añadieron 40 µl de una mezcla de DNasa I (concentración final 10^{-5} U/µl) diluida en tampón para DNasa (Tris-HCl 10 mM pH 7,0; KCl 200 mM; MgCl₂ 2,5 mM; CaCl₂ 1 mM; y EDTA 0,1 mM). Tras incubar 4 minutos a 30°C, la reacción se detuvo añadiendo 2 µl de EDTA 0,5 M pH 8,0. El ADN se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) y se precipitó a -20°C con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M (pH 5,2) y tres volúmenes de etanol absoluto. Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 12.000 g y el sedimento se lavó con etanol 70% (v/v) frío. Una vez seco, el sedimento se resuspendió en 10 µl de TE para su posterior análisis por electroforesis.

7.9.2. Footprint de protección contra metilación por dimetilsulfato (DMS)

A los 10 µl de mezcla de unión se añadió 1 µl de DMS diluido al 1,5 % (v/v) en tampón de unión. Tras incubar 2 minutos a 30°C, la reacción se detuvo añadiendo 10 µl de solución DMS Stop (acetato amónico 2,5 M; β-mercaptoetanol 1 M; EDTA 1 mM; ARN_t 100 µg/ml). El ADN se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) y se precipitó a -20°C con 1/10 de volumen de acetato sódico 3 M pH 5,2 y tres volúmenes de etanol absoluto. Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 12.000 g y el sedimento se lavó con etanol 70% (v/v) frío. Una vez seco, el ADN se resuspendió en 30 µl de agua milliQ y se trató con piperidina al 10% (v/v) durante 30 minutos a 90°C. Al finalizar la incubación, las muestras se congelaron en N₂ líquido y, para eliminar cualquier resto de piperidina del ADN tratado, se realizaron varias extracciones con butanol. Una vez seco, el sedimento se resuspendió en 10 µl de TE para su posterior análisis por electroforesis.

8. Ensayos de microscopía

8.1. Microscopía electrónica de transmisión

Para estudiar la morfología, el número y la disposición de los flagelos en la cepa silvestre y sus derivados se utilizó el microscopio electrónico de transmisión (MET) con la técnica de tinción negativa. Para ello, las cepas se crecieron en medio LB y MMF suplementado o no con floretina (0,3 mM para todas las cepas, 0,05 mM para la cepa DC3000A y 0,15 mM en MMF) hasta alcanzar una DO₆₆₀ de 0,5 a 25°C. Se colocaron 8 µl del cultivo sobre una rejilla de níquel cubierta con una película de Formvar durante 5 minutos para permitir la adhesión de las células, se secó con un papel de filtro y se contrastó añadiendo 8 µl de ácido fosfotúngstico al 1% (v/v) durante 1 minuto. La rejilla se secó y se realizaron tres lavados de 30 segundos con agua destilada, el exceso de agua se retiró con papel de filtro. Tras

secarse, las muestras se observaron en el Servicio de Microscopía Confocal y Electrónica de Transmisión (CTEM) de la Estación Experimental del Zaidín, donde se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM-1011.

8.2. Microscopía óptica

Para estudiar la abundancia de flagelos en el microscopio óptico, se utilizó la tinción de Leifson para flagelos siguiendo el protocolo descrito por Clark (1976). Una solución de 1,2% de fucsina básica preparada en 95% de etanol y estabilizada durante toda la noche a 25°C, se mezcló con un volumen igual de una solución de NaCl 0,75% y 1,5% de ácido tánico preparados en agua destilada. El pH final del colorante se ajustó a pH 5,0 con NaOH 1 N.

Las células de placas de *swarming* se recogieron (sin y con floretina 0,2 mM, crecidas durante 20 horas a 25°C) con MgCl₂ 10 mM, se ajustaron a una DO₆₆₀ de 1,0 y se fijaron con 1 ml de solución de formaldehído al 37% por cada ml de cultivo durante 30 minutos. La suspensión se centrifugó, se lavó y resuspendió en 1 ml de agua destilada. Los portaobjetos se sumergieron durante 24 horas a temperatura ambiente en una solución de dicromato ácido, se enjuagaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Una gota de suspensión de cultivo se colocó en el centro del portaobjetos, se dejó correr a lo largo de este y se secó a temperatura ambiente. A continuación, 1 ml del colorante se añadió durante 15 minutos, tras lo cual el portaobjetos se lavó con agua corriente, se secó al aire, se montó con Merckoglass (Merck) y se examinó bajo el microscopio óptico (Zeiss Axioskope).

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA PmeR/MexAB-OprM de Pto DC3000

1. Caracterización *in vivo* del sistema PmeR/MexAB-OprM de Pto DC3000

1.1. Generación de mutantes carentes de la bomba y el regulador

Con el fin de estudiar las funciones del sistema MexAB-OprM y del regulador PmeR en Pto, se construyeron mutantes inactivando estos genes mediante doble recombinación. En primer lugar, se diseñaron los diferentes vectores que se utilizaron en las mutagénesis a partir de los plásmidos pMBL-T o pGEM-T, que no replican en *Pseudomonas*. Se clonó en ellos una región que incluía el gen a mutar y posteriormente se interrumpió mediante la introducción de un interposón Ω Km que impide su expresión. En la sección Materiales y Métodos se describe en detalle cómo se generaron los plásmidos pPVG-A Ω Km y pPVG-R Ω Km (apartado 2.2) y cómo se llevó a cabo el reemplazamiento génico (apartados 3.6.4 y 3.6.5).

Los posibles clones mutantes deficientes en la bomba o en el regulador, se analizaron mediante PCR e hibridación de ADN *Southern Blot*, con el fin de confirmar la integración del interposón Ω Km en el locus genómico de *mexA* o de *pmeR*. En el ensayo *Southern Blot* se utilizó ADN cromosómico de la cepa silvestre Pto DC3000 y de los posibles mutantes, que se digirieron con *Sma*I y se hibridaron con una sonda de 2,2 kb para *mexA* y una sonda de 1,8 kb para *pmeR* (Figura 13).

Los resultados obtenidos nos permiten confirmar la interrupción del gen *mexA* con el interposón Ω Km en los mutantes deficientes en la bomba de eflujo (Figura 13A). El interposón Ω Km utilizado en este caso presenta en sus extremos sitios de corte para la enzima *Eco*47III y un sitio único *Sma*I dentro del interposón. Este sitio nos permite determinar el sentido de la inserción del Ω Km dentro del gen interrumpido. En la cepa silvestre se observa la hibridación de la sonda con un fragmento de cerca de 8,6 kb, mientras que en los mutantes se observan dos bandas de 9,5 y 1,3 kb. La mutación generada es de carácter polar debido a las características del interposón Ω Km: está flanqueado por repeticiones invertidas que contienen señales de terminación, tanto de la transcripción como de la traducción (Fellay *et al.*, 1987; Prentki y Krisch, 1984), por lo que el mutante es deficiente en los tres componentes de la bomba. Se escogió uno de los clones y se denominó al mutante carente de la bomba MexAB-OprM como DC3000A.

De igual manera, se confirmó la interrupción del gen *pmeR* con el interposón Ω Km en los mutantes deficientes en el posible regulador de la bomba (Figura 13B). En este caso, el interposón Ω Km utilizado para generar el mutante no presentaba modificaciones en los sitios de restricción, por lo que mantenía los tres sitios de corte originales para *Sma*I, dos en los extremos y uno dentro del interposón. La inserción del Ω Km también se verificó por PCR utilizando cebadores específicos para este (datos no mostrados). Se escogió uno de los clones carentes del regulador PmeR y se denominó DC3000R.

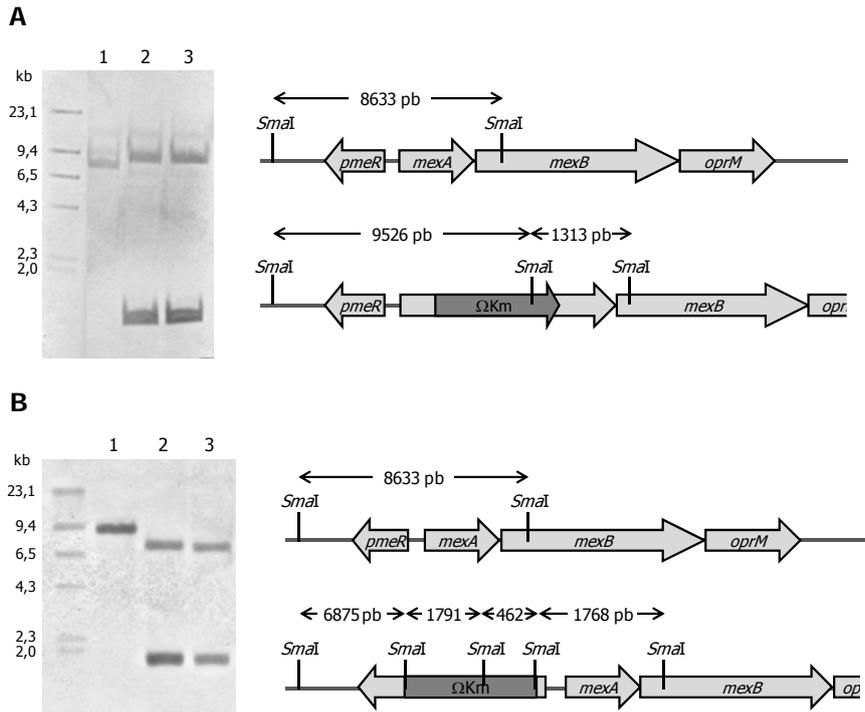


Figura 13. Hibridaciones ADN-ADN correspondientes a mutantes construidos mediante doble recombinación en Pto DC3000.

A. Hibridación *Southern* utilizando una sonda para *mexA* en la cepa silvestre Pto DC3000 (calle 1) y en dos mutantes que carecen de la bomba *mexAB-oprM* (calles 2 y 3). A la izquierda se indica el tamaño en kb del marcador de peso molecular (ADN del fago λ digerido con *Hind*III).

B. Hibridación *Southern* utilizando una sonda para *pmeR* en la cepa silvestre Pto DC3000 (calle 1) y en dos mutantes deficientes en el posible regulador (calles 2 y 3). A la izquierda se indica el tamaño en kb del marcador de peso molecular (ADN del fago λ digerido con *Hind*III).

En los dos casos, el esquema de la derecha indica los sitios de corte y el tamaño esperado de los fragmentos obtenidos con la enzima *Sma*I, tanto en la cepa silvestre como en los mutantes.

1.2. Determinación del perfil de sustratos de la bomba MexAB-OprM

Los sistemas transportadores homólogos a la bomba de eflujo MexAB-OprM de Pto DC3000 están involucrados en la resistencia a múltiples antibióticos y disolventes orgánicos. Con el fin de determinar el perfil de sustratos de la bomba MexAB-OprM de Pto DC3000, se examinó la susceptibilidad de la cepa silvestre y los mutantes DC3000A y DC3000R a distintos tipos de antibióticos (ampicilina, carbenicilina, cloranfenicol, tetraciclina, ácido nalidíxico, norfloxacin, estreptomicina, piperacilina), agentes biocidas o mutagénicos (bromuro de etidio y triclosan) y compuestos de origen vegetal con capacidad antimicrobiana (hesperetina, (+)-catequina, morina, naringenina, floridzina, floretina y quercetina). Se utilizó el método de diluciones seriadas para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada compuesto (Tabla 12).

Tabla 12. Susceptibilidad de la cepa Pto DC3000 y el mutante DC3000A a diferentes compuestos antimicrobianos

Compuesto	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	DC3000	DC3000A	DC3000A (pBBRMEX)
Ácido nalidíxico	8	0,25	128
Ampicilina	62	0,39	500
Bromuro de etidio	78	20	-
Butilparabeno	759	379	-
Carbenicilina	128	0,5	512
(+)-Catequina	> 9.072	1.814	-
Cefotaxima	7,8	0,08	31,25
Cloranfenicol	3,1	0,39	_*
Estreptomina	1,50	1,50	-
Floretina	8.571	857	-
Floridzina	29.528	3.691	-
Gentamicina	0,5	0,5	-
Hesperetina	> 18.894	> 18.894	-
Metilparabeno	594	297	-
Morina	> 9.447	471	-
Naringenina	> 11.633	582	-
Norfloxacina	0,098	0,031	-
Piperacilina	1,56	0,039	-
Quercetina	> 16.913	> 16.913	-
Tetraciclina	0,50	0,05	8
Triclosan	0,98	0,98	-

-, no determinado. * El plásmido usado para complementar confiere resistencia a ese antibiótico

Con el ensayo de MIC se pudo apreciar que, en ausencia de la bomba MexAB-OprM (mutante DC3000A), aumenta la sensibilidad de la cepa a ciertos compuestos antimicrobianos en comparación con la cepa silvestre (Tabla 12). Solo en el caso de los antibióticos de tipo aminoglucósido, como la gentamicina y la estreptomina, el valor de la MIC de las cepas silvestre y mutante en la bomba no varió, lo que sugiere que tales antibióticos no son sustratos de la bomba. El mutante DC3000A resultó ser significativamente más sensible a los antibióticos β -lactámicos (ampicilina, carbenicilina y piperacilina), ya que el valor de MIC fue 159, 256 y 40 veces menor, respectivamente, que el de la cepa silvestre.

La complementación en *trans* del mutante deficiente de la bomba con el plásmido pBBRMEX, que porta el operón completo *mexAB-oprM* de Pto DC3000, restauró la resistencia a los compuestos antimicrobianos ensayados (Tabla 12). El nivel de resistencia del mutante DC3000A complementado fue de 4 a 16 veces mayor que el de la cepa silvestre, lo que sugiere un efecto de la dosis génica debido a la presencia de *mexAB-oprM* en el plásmido. En general, la mayor sensibilidad de la cepa que carece del sistema MexAB-OprM es una clara evidencia de que este transportador está implicado en la resistencia a múltiples antibióticos en Pto DC3000.

Cuando se estaban llevando a cabo estos experimentos en junio de 2008 se publicó el artículo: Characterization of the RND-type multidrug efflux pump MexAB-OprM of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*, por Stoitsova *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3387-3393. En él se demostraba que la delección del transportador MexAB-OprM en tres patovares de *P. syringae* reducía drásticamente la tolerancia a una amplia variedad de agentes antimicrobianos (Tabla 13).

Tabla 13. Perfil de susceptibilidad a compuestos antimicrobianos de Pto DC3000 y DC3000 Δ mexAB-oprM.
Modificada de Stoitsova *et al.* (2008).

Compuesto	MIC (μ g/ml)	
	DC3000	DC3000 Δ mexAB-oprM
Acriflavina	31	2,5
Ácido nalidixico	25	3,1
Ácido fusárico	1.000	62,5
Ampicilina	62,5	0,8
Berberina	1.000	125
Bromuro de etidio	125	6,2
Carbenicilina	500	3,1
Cefoperazona	31	1,5
Cloranfenicol	31	1,5
Cristal violeta	25	1,5
Eritromicina	12,5	3,1
Estreptomicina	6,2	3,1
Floretina	> 1.000	250
Gentamicina	0,6	0,3
Kanamicina	0,6	1,2
Naringenina	> 1.000	250
Nitrofurantoína	500	125
Norfloxacina	0,5	0,06
Piperacilina	15,6	0,3
Rodamina 6G	500	31
Tetraciclina	0,5	0,03

Los valores de MIC que obtuvimos para algunos de los compuestos ensayados con la cepa silvestre y el mutante DC3000A varían notablemente con respecto a los valores obtenidos por Stoitsova y colaboradores (Tabla 13). Esto ocurre para ácido nalidixico, carbenicilina, cloranfenicol, bromuro de etidio, estreptomicina, norfloxacina y piperacilina. A pesar de esas diferencias, el comportamiento es similar: los mutantes deficientes en el transportador son más sensibles que la cepa silvestre a los mismos compuestos antimicrobianos, demostrando que el sistema MexAB-OprM es capaz de expulsar agentes mutagénicos, como el bromuro de etidio, y compuestos antimicrobianos producidos por las plantas, como berberina, naringenina y floretina. Asimismo, coincidían los resultados de MIC obtenidos para los antibióticos de tipo aminoglucósido (estreptomicina y gentamicina), que demuestran que tales

compuestos no son sustratos de la bomba. Más aún, al examinar la susceptibilidad de las cepas silvestre y mutante DC3000A a compuestos antimicrobianos no ensayados por Stoitsova *et al.* (2008) (antibióticos como la cefotaxima, biocidas como butilparabeno y metilparabeno y compuestos de origen vegetal con capacidad antimicrobiana como (+)-catequina, morina y floridzina) hemos identificado nuevos sustratos de la bomba MexAB-OprM de Pto DC3000.

Por otra parte, en la cepa DC3000R (mutante deficiente en el regulador PmeR) se observó que los valores de MIC para todos los compuestos ensayados excepto para estreptomycin y gentamicina, eran superiores a los de la cepa silvestre, lo que sugería que este regulador podía controlar la expresión del operón *mexAB-oprM* reprimiéndolo (Tabla 14).

Tabla 14. Susceptibilidad de la cepa Pto DC3000 y el mutante DC3000R a diferentes compuestos antimicrobianos

Compuesto	MIC(µg/ml)		
	DC3000	DC3000R	DC3000R (pPV4R)
Ácido nalidixico	8	32	8
Ampicilina	62	156	- *
Bromuro de Etidio	78	156	78
Butilparabeno	759	1517	759
Carbenicilina	128	512	- *
(+)-catequina	> 9.072	> 9.072	> 9.072
Cefotaxima	7,8	62,5	7,8
Cloranfenicol	3,1	12,5	3,1
Estreptomycin	1,50	1,50	1,50
Floretina	8.571	> 8.572	4.286
Floridzina	29.528	> 29.528	7.382
Gentamicina	0,5	0,5	0,5
Hesperetina	> 18.894	> 18.894	> 18.894
Metilparabeno	594	1.188	594
Morina	> 9.447	> 9.447	> 9.447
Naringenina	> 11.633	> 11.633	11.633
Norfloxacin	0,098	0,488	0,098
Piperacilina	1,56	3,12	- *
Quercetina	> 16.913	> 16.913	>16.913
Tetraciclina	0,50	2,00	- *
Triclosan	0,98	0,98	0,98

-, no determinado. *El plásmido usado para complementar confiere resistencia a esos antibióticos.

Debido a la baja solubilidad de los flavonoides en agua, en muchas ocasiones no fue posible distinguir entre los valores de MIC de la cepa silvestre y los mutantes. Para evitar este problema se llevaron a cabo ensayos de sensibilidad por difusión en placa, determinando el halo de inhibición de crecimiento causado por cada compuesto (Figura 14).

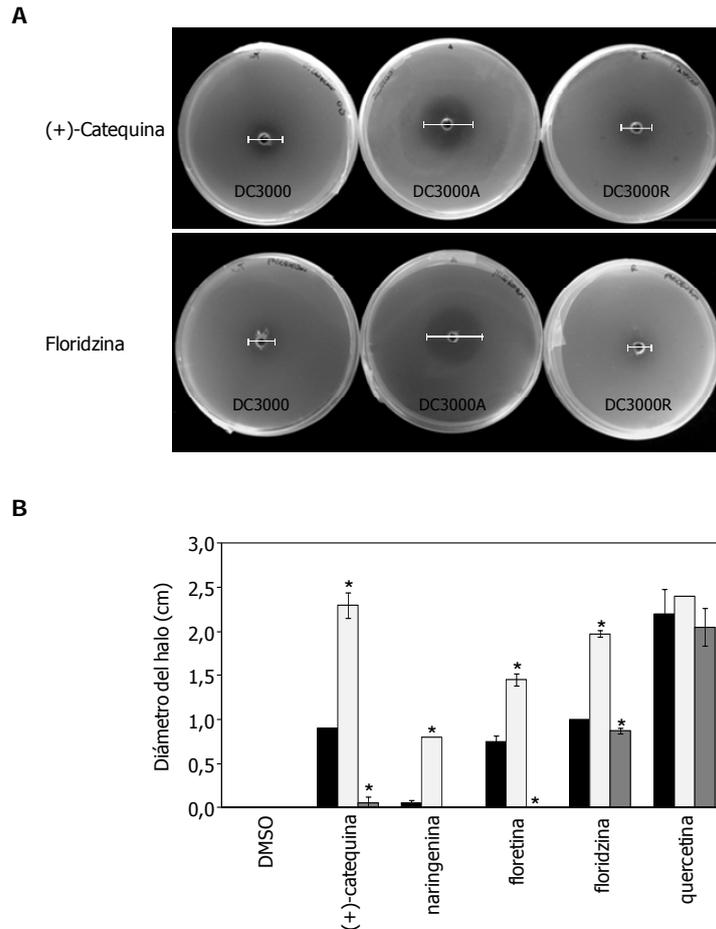


Figura 14. Susceptibilidad de diferentes cepas de Pto a flavonoides.

Se llevaron a cabo ensayos de sensibilidad por difusión en placa con las cepas Pto DC3000, DC3000A y DC3000R inoculadas directamente en el medio (LB con 1% de agar) a un título final de 10^6 ufc/ml. Se realizaron orificios de 5 mm de diámetro en el centro de la placa que se llenaron con 50 μ l de una solución de flavonoide. La cantidad final de cada compuesto fue: 7,3 mg de (+)-catequina, 7,6 mg de morina, 9,3 mg de naringenina, 6,9 mg de floretina, 11,8 mg de floridzina y 8,5 mg de quercetina. El halo de inhibición del crecimiento se midió y fotografió tras incubar las placas a 26°C durante 24 horas.

A. Placas de ensayos de sensibilidad por difusión en placa con las cepas DC3000, DC3000A y DC3000R en presencia de (+)-catequina y floridzina. Las líneas en blanco señalan el halo de inhibición.

B. Los halos de inhibición obtenidos para DC3000 (negro), DC3000A (blanco) y DC3000R (gris) en presencia del control (DMSO) y de las soluciones de flavonoides utilizadas se midieron y se calculó el promedio de la zona de inhibición (3 réplicas por placa). Los asteriscos indican que las diferencias con la cepa silvestre son significativas ($P > 0,05$).

Como control se utilizó DMSO (utilizado para disolver los flavonoides) con el fin de verificar que la zona de inhibición se debía al flavonoide y no al disolvente. Efectivamente, el DMSO no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de ninguna de las cepas (Figura 14B).

Con este ensayo se observó que la cepa deficiente en la bomba MexAB-OprM presentaba halos de inhibición del crecimiento alrededor de (+)-catequina (2,3 cm), floridzina (1,97 cm) y floretina (1,45 cm). El diámetro de los halos fue aproximadamente 2 veces mayor que los obtenidos con la cepa silvestre (0,9, 1 y 0,75 cm, respectivamente), lo que sugiere que estos flavonoides son sustratos de la bomba (Figura 14). Por su parte, el mutante carente de PmeR fue más resistente que la cepa silvestre

a (+)-catequina y floretina, ya que no se observaron halos de inhibición de crecimiento (Figura 14). Este ligero pero reproducible incremento en la resistencia a varios antibióticos y otros compuestos antimicrobianos que se observa con el mutante DC3000R (Tabla 14 y Figura 14) es probablemente causado por el incremento en la expresión del transportador debido a la eliminación del represor. La complementación del mutante deficiente en *pmeR* con el plásmido pPV4R, que porta *pmeR* de Pto DC3000, restaura la sensibilidad a todos los antimicrobianos ensayados (Tabla 14). El nivel de resistencia del mutante *pmeR* complementado en *trans* a los compuestos derivados de plantas (floridzina, floretina y naringenina) fue menor que el de la cepa silvestre, lo que podría deberse a la diferente dosis génica, ya que en la cepa complementada *pmeR* se encuentra en un plásmido.

De esta manera, a través del uso de la cepa deficiente en *pmeR* también hemos definido nuevos sustratos específicos de la bomba de eflujo MexAB-OprM, ya que hemos comprobado que la resistencia a varios flavonoides se ve comprometida en una cepa que carece de MexAB-OprM y aumenta en la cepa deficiente en *pmeR* (Tabla 14 y Figura 14). Así, butilparabeno, (+)-catequina, cefotaxima, metilparabeno, morina, y floridzina son también sustratos del transportador MexAB-OprM de Pto DC3000. Por tanto, esta bomba elimina compuestos antimicrobianos de naturaleza y estructura química muy diferente, confiriéndole a Pto DC3000 resistencia intrínseca a una amplia gama de antibióticos y otros agentes antimicrobianos de distinto origen.

1.3. Estudio de la expresión del sistema *PmeR/MexAB-OprM* en Pto DC3000

1.3.1. Análisis de la organización transcripcional de los genes *mexAB-oprM*

Dada la alta homología de secuencia de *mexAB-oprM* con otros transportadores de tipo RND ya descritos en diferentes cepas de *Pseudomonas* y la similitud de su organización génica, cabía esperar que estos tres genes se expresaran como un operón. Además, los ORFs de *mexA* y *mexB* están separados por tan solo 3 pares de bases y el codón terminador de *mexB* solapa con el codón de inicio de *oprM*.

Con el fin de demostrar que *mexAB-oprM* se transcribe como una unidad transcripcional, se realizaron ensayos de transcripción reversa acoplados a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a partir de ARN total aislado de células de Pto DC3000 en fase exponencial cultivadas en medio rico LB. Los cebadores utilizados (Tabla 10) eran complementarios a regiones correspondientes al final y al inicio de los genes consecutivos (*mexA-mexB* y *mexB-oprM*, Figura 15A). Los productos de RT-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v), obteniéndose fragmentos de amplificación del tamaño esperado para cada pareja de cebadores (calles 1 y 4, Figura 15B): 613 pb

entre *mexA-mexB* y 372 pb entre *mexB-oprM*. No se observó amplificación en los controles negativos, en los que no se añadió reverso transcriptasa, lo que indica la ausencia de ADN contaminante en la reacción. La amplificación obtenida a partir del transcrito, entre la región final de un gen y la región inicial del siguiente, permite afirmar que los genes *mexAB-oprM* forman parte de la misma unidad transcripcional y constituyen un operón.

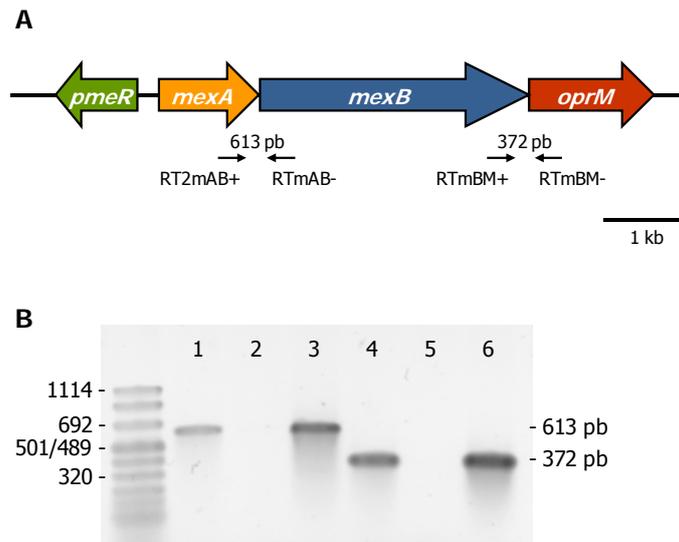


Figura 15. Análisis de la organización transcripcional de los genes *mexAB-oprM* en Pto DC3000 mediante RT-PCR.

A. Representación esquemática de la organización de los genes del sistema *pmeR/mexAB-oprM* donde los diferentes marcos abiertos de lectura se representan con flechas anchas. Se indica también la localización de los cebadores usados para la amplificación del ARN total en el ensayo de RT-PCR como flechas debajo de los genes, así como el tamaño esperado del ADN amplificado.

B. Electroforesis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR. Las calles 1 y 3 corresponden a las amplificaciones con los cebadores RT2mAB+ y RTmAB- utilizando como molde ARN total y ADN cromosómico, respectivamente. Las calles 4 y 6 corresponden a las amplificaciones con los cebadores RTmBM+ y RTmBM- utilizando como molde ARN total y ADN cromosómico, respectivamente. Las calles 2 y 5 corresponden a los controles negativos de la RT-PCR que contenían la misma cantidad de ARN total, mezcla de reacción y la enzima Taq ADN polimerasa, pero no la transcriptasa reversa. A la izquierda se indican los tamaños en pb de algunas bandas del marcador de peso molecular (marcador VIII, Roche).

1.3.2. Localización de los puntos de inicio de la transcripción e identificación de los promotores de *pmeR* y *mexAB-oprM*

Los genes de la bomba tripartita *mexAB-oprM* se transcriben como un operón al igual que diversos transportadores de tipo RND presentes en otras *Pseudomonas*. En estas cepas también existe un gen que se transcribe divergentemente con respecto a los genes estructurales de la bomba y que codifica una proteína reguladora (Figura 15A). En Pto, la región intergénica comprendida entre los ATG iniciales de *mexA* y *pmeR* se extiende 254 pb y en ella se deben encontrar los correspondientes promotores $P_{mexAB-oprM}$ y P_{pmeR} .

Para definir la(s) región(es) promotora(s) del operón *mexAB-oprM* y de *pmeR* y determinar los puntos de inicio de la transcripción, se realizaron ensayos de extensión reversa (Figura 16). Los resultados indican que el operón *mexAB-oprM* se transcribe a partir de un único promotor (Figura 16A), ya que se observa una banda específica de ADNc correspondiente al transcrito de este operón. Además, la intensidad de la banda obtenida resultó mayor en el mutante DC3000R en comparación con la cepa silvestre, lo que concuerda con la predicción de que PmeR es un represor de la familia de reguladores transcripcionales de TetR. Hemos identificado el sitio de iniciación de la transcripción de *mexA* en la A localizada 79 pb por encima del primer ATG. El análisis detallado de esta región permitió predecir las cajas -10 (TATATT) y -35 (TTTACA) del promotor *mexAB-oprM*, que están separadas entre sí por 18 pb (Figura 16C) y que son similares a las secuencias consenso de promotores reconocidos por el factor de transcripción σ^{70} de la ARN polimerasa (Lisser y Margalit, 1993).

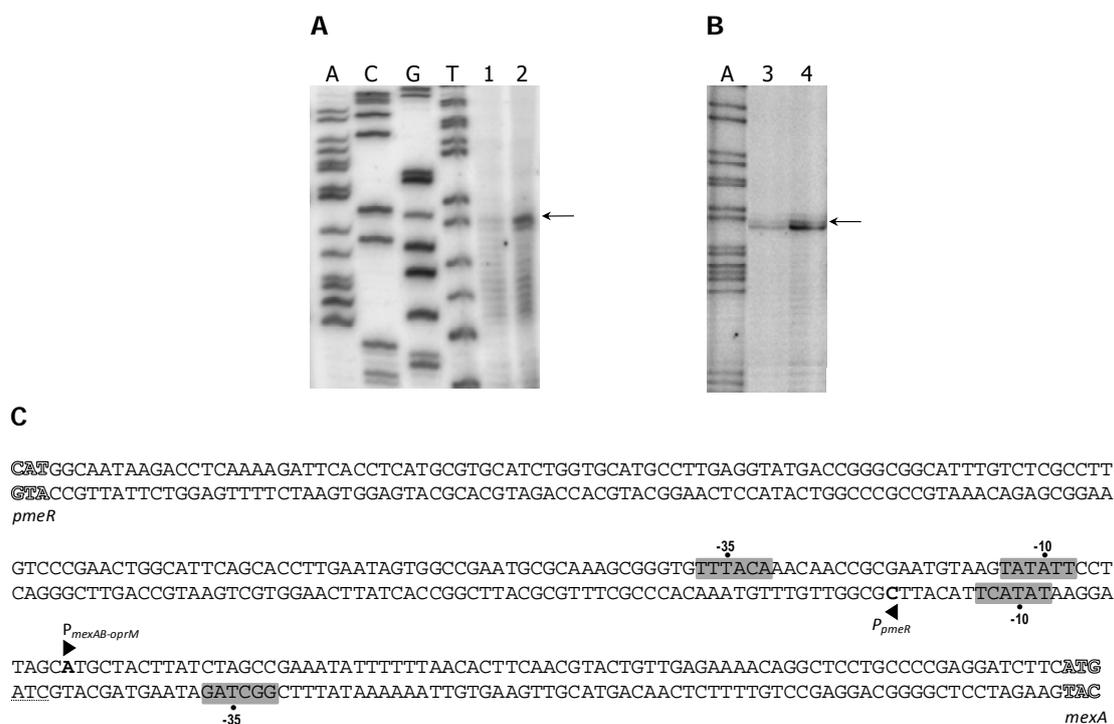


Figura 16. Determinación de los puntos de inicio de la transcripción mediante ensayos de extensión reversa a partir de un cebador.

20 μ g (para *mexAB-oprM*) y 30 μ g (para *pmeR*) del ARN total de la cepa silvestre DC3000 (calles 1 y 3) y del mutante DC3000R (calles 2 y 4) obtenido de cultivos en LB a una $DO_{660}=1,5$, se utilizaron en las reacciones de transcripción reversa para generar los correspondientes ADNc, como se describe en la sección 6.4.2 de Materiales y Métodos. Las calles A, C, G y T contienen los productos de las reacciones de secuenciación realizadas con los mismos cebadores utilizados para cada transcripción reversa. Las flechas situadas a la derecha, indican el producto de ADNc obtenido tras la reacción en el caso del operón *mexAB-oprM* (A) o del gen *pmeR* (B).

C. Secuencia de nucleótidos de la región intergénica *pmeR-mexA*. Las posiciones -10 y -35 de P_{pmeR} y P_{mexA} están indicadas por un punto, el punto de inicio +1 (en negrita) y el sentido de la transcripción están marcados con una punta de flecha; también se muestran los respectivos codones de iniciación (letras huecas).

En el caso de *pmeR*, se detectó una banda específica de ADNc en las muestras de la cepa silvestre y de DC3000R, pero la intensidad de esta banda en la cepa silvestre parecía ser sustancialmente menor que en el mutante deficiente en *pmeR* (Figura 16B). Este resultado sugiere que PmeR regula su propia expresión, como es el caso de otros represores de la familia y el mismo TetR (Hillen y Berens, 1994). Asimismo, se determinó el sitio de inicio de la transcripción de *pmeR* como la G-154 con respecto al primer ATG. Al igual que en el caso anterior, el análisis de esa región permitió predecir las secuencias -35 (GGCTAG) y -10 (TATACT) del promotor *pmeR*, que están separadas 20 pb en este caso (Figura 16C) y que son también similares a las consenso de promotores dependientes de σ^{70} .

La localización de los sitios de iniciación de la transcripción indica que *pmeR* y *mexA* se transcriben divergentemente, sus promotores solapan parcialmente y probablemente están bajo el control del mismo regulador, seguramente PmeR (Figura 16C).

1.3.3. Identificación de compuestos inductores de la expresión del operón *mexAB-oprM* y del gen *pmeR*

Con el fin de determinar si los compuestos identificados previamente como sustratos de la bomba (Stoitsova *et al.*, 2008) y los nuevos identificados en este estudio influían en la expresión *in vivo* del operón de la bomba de eflujo *mexAB-oprM* y del gen regulador *pmeR*, se construyeron los plásmidos pPV1A y pPV2R y se introdujeron en la cepa Pto DC3000. En ellos, el fragmento correspondiente a la región intergénica *pmeR-mexA* se clonó en ambas direcciones generando las fusiones transcripcionales $P_{mexAB-oprM}::lacZ$ y $P_{pmeR}::lacZ$, respectivamente.

La expresión de los promotores se cuantificó midiendo la actividad β -galactosidasa en cultivos de Pto DC3000 crecidos en LB en ausencia y presencia de diferentes sustratos de la bomba, los cuales se añadieron desde el principio en el cultivo a concentraciones subletales para que no afectaran el crecimiento de la cepa con respecto al cultivo control (sin compuesto). Entre los compuestos ensayados se incluyeron antibióticos (ampicilina, carbenicilina, cloranfenicol y kanamicina), así como compuestos de origen vegetal con capacidad antimicrobiana [(+)catequina, genisteína, luteolina, naringenina, floridzina y floretina]. Algunos de estos compuestos de origen vegetal han sido descritos como inductores de la expresión en sistemas de transporte homólogos a MexAB-OprM en otras bacterias asociadas a plantas (Burse *et al.*, 2004a; Maggiorani-Valecillos *et al.*, 2006; Palumbo *et al.*, 1998).

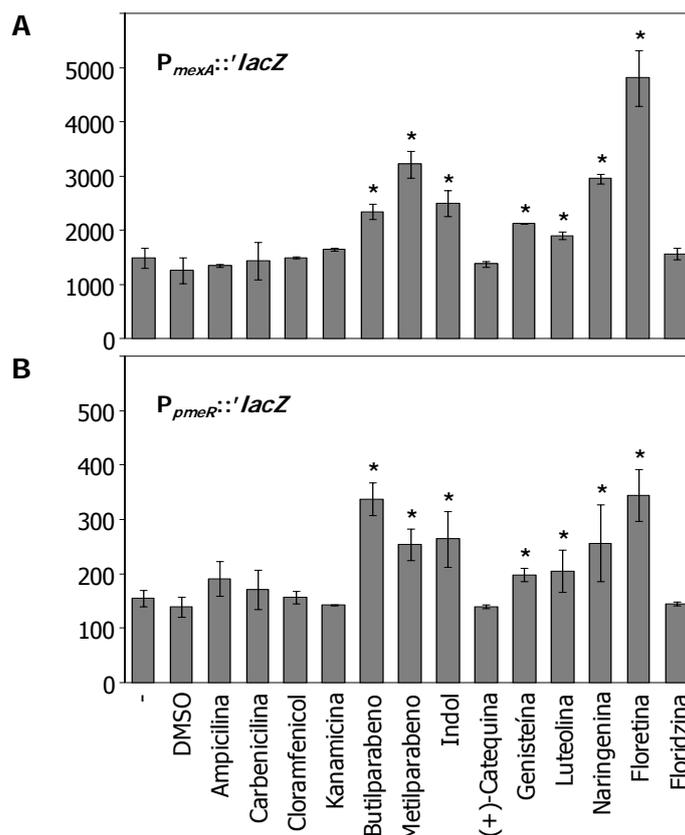


Figura 17. Expresión de los promotores de *mexAB-oprM* y *pmeR* en presencia de diferentes compuestos antimicrobianos.

La actividad β-galactosidasa de los promotores *mexAB-oprM* (A) y *pmeR* (B) se determinó en cultivos de la cepa Pto DC3000 (pPV1A o pPV2R) crecidos hasta DO_{660} 2,0 en ausencia (-) o en presencia de diferentes sustratos de la bomba a concentraciones subletales: ampicilina (3 μg/ml), butilparabeno (0,5 mM), carbenicilina (40 μg/ml), (+)-catequina (1 mM), cloranfenicol (2 μg/ml), floretina (0,4 mM), floridzina (1 mM), genisteína (0,5 mM), indol (0,3 mM), kanamicina (0,1 μg/ml), luteolina (0,5 mM), metilparabeno (0,4 mM) y naringenina (1 mM). Los compuestos se disolvieron en DMSO cuando fue necesario. Los gráficos muestran el promedio de tres experimentos independientes con sus respectivas desviaciones estándar. * indica que el incremento en la actividad β-galactosidasa es significativo respecto a la condición control (sin compuesto), determinado mediante análisis de varianza ($P < 0,05$).

La actividad β-galactosidasa obtenida desde el promotor $P_{mexAB-oprM}$ varía según los compuestos ensayados (Figura 17A). En ausencia de sustratos de la bomba, este promotor tiene una actividad basal notable (alrededor de 1.500 unidades Miller), como ya habíamos observado en el ensayo de extensión reversa a partir de cebador (Figura 16A). La actividad β-galactosidasa de $P_{mexAB-oprM}$ aumentó significativamente en presencia de floretina (3,2 veces), metilparabeno (2,2 veces) y naringenina (2 veces), siendo la floretina el mejor inductor. La adición de indol y butilparabeno provocó una inducción moderada (1,7 y 1,6 veces, respectivamente), mientras que genisteína y luteolina indujeron levemente la actividad β-galactosidasa (1,4 y 1,3 veces, respectivamente). Otros compuestos, como los antibióticos ampicilina, carbenicilina, cloranfenicol y kanamicina, o los flavonoides (+)-catequina y floridzina, no incrementaron la expresión del promotor, a pesar de ser sustratos de la bomba MexAB-

OprM. Por tanto, se observa que no todos los sustratos de la bomba inducen su expresión. En general, la actividad β -galactosidasa del promotor de *pmeR* es menor que la de $P_{mexAB-oprM}$, pero el patrón de inducción y expresión de ambos es similar (Figura 17B).

1.3.4. Determinación del papel de PmeR en la expresión del sistema PmeR/MexAB-OprM

Como se ha mencionado anteriormente, el producto del gen *pmeR* presenta homología con proteínas de la familia de reguladores transcripcionales TetR. Este hecho, junto con su proximidad a los genes estructurales que codifican para el operón de la bomba y los resultados presentados en los apartados anteriores, sugieren que PmeR actúa localmente reprimiendo la expresión de *mexAB-oprM* y probablemente su propia expresión, como es el caso de otros reguladores transcripcionales de la misma familia (Hernández *et al.*, 2009; Hillen y Berens, 1994; Hirooka *et al.*, 2007). Para confirmar esta hipótesis, se evaluó la expresión de *mexAB-oprM* y *pmeR* en las cepas Pto DC3000 (silvestre), DC3000A, y DC3000R mediante qRT-PCR, tanto en ausencia como en presencia de floretina, el compuesto que provoca la máxima inducción de la expresión en ambos promotores (Figura 17).

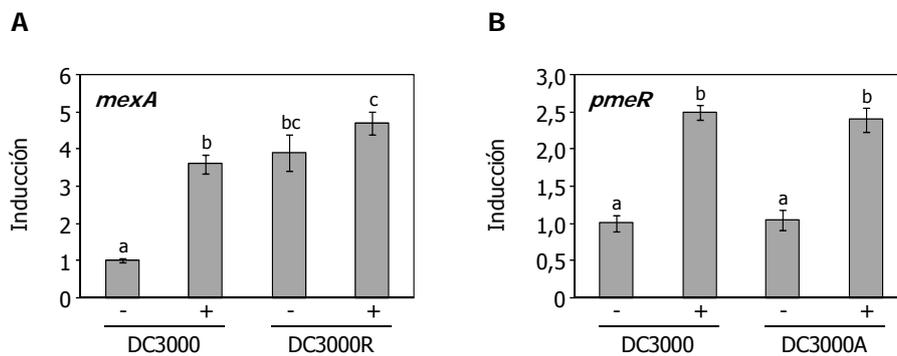


Figura 18. Análisis mediante PCR cuantitativa de los niveles de expresión relativa de *mexAB-oprM* y *pmeR* en diferentes cepas de Pto.

Las cepas DC3000, DC3000A y DC3000R se cultivaron en LB en ausencia y presencia de floretina 0,3 mM (0,05 mM para el mutante DC3000A) hasta una DO_{660} de 1,5. La expresión de *gyrA* se utilizó para normalizar. Los resultados mostrados corresponden a los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes con tres réplicas. Las letras (a, b, y c) indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) determinadas mediante análisis de varianza.

El cálculo de la expresión relativa a partir de los datos de la qRT-PCR se hizo mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001), como se describe en Materiales y Métodos (apartado 6.6.6). Los resultados obtenidos muestran que en la cepa silvestre la floretina induce la expresión del operón de la bomba y del gen *pmeR* 3,6 y 2,5 veces, respectivamente, (Figura 18). En el mutante DC3000A, el promotor *pmeR* se comportó de manera similar a la cepa silvestre (Figura 18B); sin embargo, en el mutante DC3000R, los niveles de expresión de *mexA* fueron 3,6 veces superiores a los de la cepa

silvestre y se observó aún un leve incremento de 1,3 veces en presencia de floretina (Figura 18A). Estos resultados permiten confirmar el efecto de PmeR sobre la expresión de los genes de la bomba pero no sobre su propia expresión ya que, dada la naturaleza de las mutaciones (inserción de un interposón con terminadores de transcripción y traducción), no fue posible el análisis de los transcritos de *mexA* y *pmeR* en DC3000A y DC3000R, respectivamente.

En algunos casos, la expresión de transportadores similares a MexAB-OprM, como *acrAB* de *E. coli* o *mexAB-oprM* de *P. aeruginosa*, depende de la fase de crecimiento, observándose que los niveles de expresión aumentaban en la fase exponencial tardía (Evans y Poole, 1999; Ma *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2002b). Para estudiar si sucedía lo mismo en Pto y poder confirmar el efecto de PmeR sobre ambos promotores, se llevaron a cabo ensayos de actividad β -galactosidasa en la cepa Pto DC3000 silvestre y en las mutantes DC3000A y DC3000R, a lo largo de la curva de crecimiento en LB tanto en ausencia como en presencia de floretina (Figura 19).

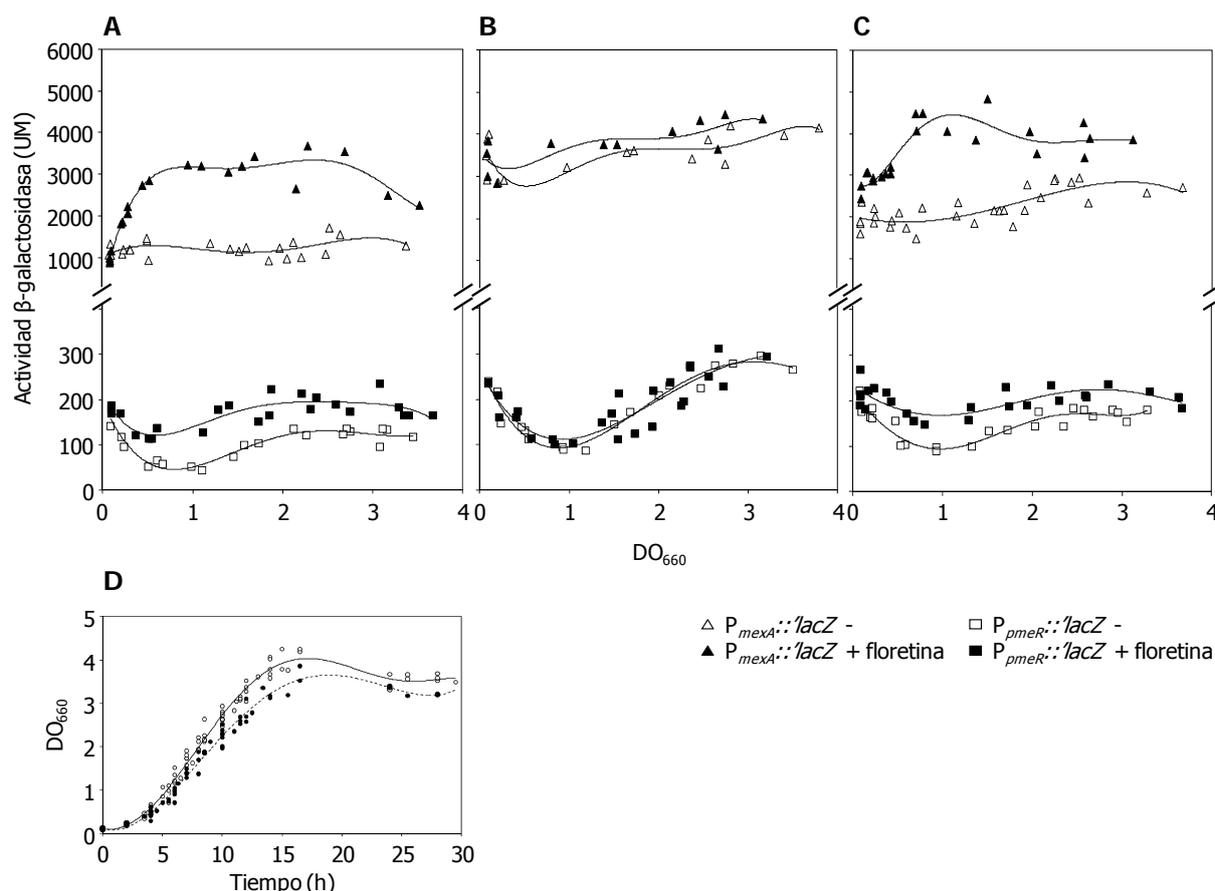


Figura 19. Expresión de los promotores de *mexAB-oprM* y *pmeR* en Pto DC3000, DC3000R, y DC3000A.

La actividad β -galactosidasa de los promotores *mexAB-oprM* (Δ) y *pmeR* (\square) se determinó en cultivos crecidos en ausencia (símbolos en blanco) o presencia (símbolos negros) de floretina 0,3 mM (0,05 mM para el mutante DC3000A). Los resultados mostrados corresponden a, al menos, 4 experimentos independientes. **A.** DC3000; **B.** DC3000R; **C.** DC3000A; **D.** Curva de crecimiento de DC3000 en ausencia (\circ) y presencia (\bullet) de floretina 0,3 mM. Las otras cepas presentaron una curva de crecimiento similar.

En la cepa DC3000 cultivada en ausencia de floretina, la actividad basal de $P_{mexAB-oprM}$ se mantuvo constante, mientras que la de P_{pmeR} aumentaba a lo largo de la curva de crecimiento (Figura 19A). En presencia de floretina, la expresión de ambos promotores aumentó con respecto al nivel basal, hasta 2,5 veces en el caso de $P_{mexAB-oprM}$ y 1,7 veces en el caso de P_{pmeR} . Sin embargo, es posible apreciar que la expresión de $P_{mexAB-oprM}$ fue significativamente mayor que la de P_{pmeR} (aproximadamente 10 veces), tanto en ausencia como en presencia de floretina (Figura 19A). Estos resultados sugieren que, a diferencia de las bombas de eflujo de *E. coli* y *P. aeruginosa*, la expresión del transportador MexAB-OprM no depende de la fase de crecimiento.

Al analizar los resultados obtenidos con la cepa DC3000R, se observó que la inactivación de *pmeR* en este mutante provocó un incremento de aproximadamente 3 veces en la expresión basal de $P_{mexAB-oprM}$ (Figura 19B). Esto indica que PmeR actúa como represor del promotor de la bomba de eflujo, ya que, en ausencia de este regulador, puede llegar a expresarse casi al mismo nivel que en presencia de un inductor (Figura 19B). La expresión del promotor de P_{pmeR} en la cepa DC3000R también aumentó, independientemente de la presencia o no de floretina (Figuras 19 A y B). Además, se observó que la expresión de P_{pmeR} a lo largo de la curva de crecimiento aumentaba gradualmente en todas las cepas conforme los cultivos se acercaban a la fase estacionaria del crecimiento, siendo este efecto más evidente en el mutante DC3000R (Figura 19B). Por tal razón, se consideró la posibilidad de que la expresión de P_{pmeR} fuera dependiente de RpoS. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la expresión de P_{pmeR} a lo largo de la curva de crecimiento en un mutante *rpoS* en comparación con la cepa silvestre (Figura 20), lo que sugiere que el aumento de expresión de P_{pmeR} en la transición a fase estacionaria no depende de este factor sigma.

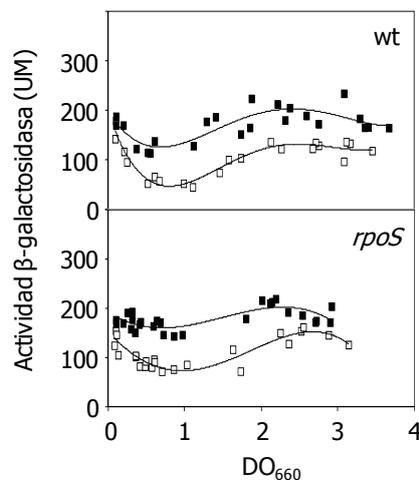


Figura 20. Expresión del promotor *pmeR* en Pto DC3000 y en el mutante *rpoS*.

La actividad β-galactosidasa del promotor *pmeR* se determinó en cultivos crecidos en ausencia (□) y presencia (■) de floretina (0,3 mM) en las cepas Pto DC3000 (panel superior) y Pto *rpoS* (panel inferior). Los resultados mostrados corresponden a, al menos, 3 experimentos independientes.

Al estudiar el comportamiento de $P_{mexAB-oprM}$ y P_{pmeR} en la cepa DC3000A, se observó que la eliminación de la bomba de eflujo provocó un aumento de casi 2 veces en la expresión basal de $P_{mexAB-oprM}$ en comparación con la cepa silvestre, aumento que también se apreció en presencia de floretina (Figura 19C). El promotor de $pmeR$ mostró el mismo comportamiento, aunque de manera más sutil (Figura 19C). El aumento del nivel basal de expresión de ambos promotores en el mutante DC3000A podría ser consecuencia de la ausencia de la bomba con la consiguiente acumulación de un sustrato desconocido que podría actuar como inductor. Asimismo, el aumento del nivel de expresión de $P_{mexAB-oprM}$ y P_{pmeR} en presencia de floretina, puede atribuirse a la acumulación de este compuesto en la célula debido a la ausencia de la bomba de eflujo MexAB-OprM.

En resumen, estos resultados demuestran que PmeR reprime no sólo la expresión del promotor de $mexAB-oprM$ sino también su propio promotor, lo que demuestra el carácter represor de este regulador y su autorregulación. La similitud en el patrón de expresión e inducción de la bomba tripartita y del regulador también avalan este mecanismo común de regulación, que es probablemente consecuencia de solapamiento de sus regiones promotoras. Al mismo tiempo y tal y como indican los resultados del apartado 1.2, el mutante que carece de PmeR presenta un ligero pero reproducible incremento en la resistencia a varios antibióticos y compuestos antimicrobianos, que se explica por el aumento de expresión del transportador debido a su desrepresión tras la eliminación del represor y concuerda con el alto nivel basal de expresión de $mexAB-oprM$ observado en ese mutante (Tabla 14 y Figuras 16, 18 y 19).

2. Caracterización bioquímica y funcional del regulador PmeR de Pto DC3000

2.1. Purificación de la proteína PmeR

2.1.1. Clonación y sobreexpresión de la proteína PmeR

Para realizar la caracterización del regulador PmeR se clonó el marco abierto de lectura de $pmeR$ en el vector de expresión pET-29a(+) como se describe en la sección 2.2 de Materiales y Métodos, obteniendo el plásmido pPV3. Dicha construcción porta el gen $pmeR$ con su propio codón de terminación y se utilizó para sobreexpresar la proteína PmeR nativa.

La producción controlada de PmeR se realizó en la cepa *E. coli* B834 (DE3) previamente transformada con el plásmido pPV3. Tras comprobar, como se describe en el apartado 7.2 de Materiales y Métodos, que las condiciones de sobreproducción de la proteína eran las óptimas, se procedió a la purificación de la proteína PmeR a partir de la fracción soluble de los extractos celulares (Figura 21).

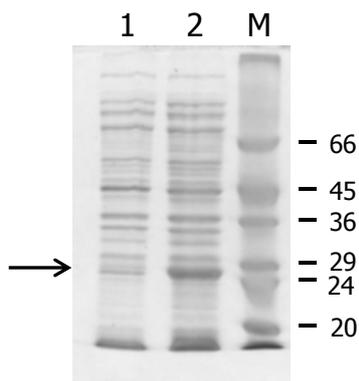


Figura 21. Inducción de la expresión de la proteína PmeR.

Análisis por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 10% (p/v) de las fracciones celulares obtenidas de *E. coli* B834 (DE3) portadora del plásmido pPV3 a partir de las alícuotas recuperadas antes (calle 1) y después (calle 2) de la inducción durante 3 horas con 1 mM de IPTG. En el margen derecho se indica en kDa los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular (M). La flecha indica la banda correspondiente a PmeR.

2.1.2. Purificación de la proteína PmeR nativa

La purificación de la proteína PmeR se realizó por doble cromatografía: la primera fue una cromatografía de afinidad en columna de heparina, en la que quedan retenidas preferentemente las proteínas que se unen al ADN, seguida de una segunda cromatografía de exclusión molecular, que permite la separación de las proteínas según su tamaño y volumen globular en solución.

En la Figura 22A se muestra el gel desnaturalizante con las fracciones de la cromatografía en columna de heparina. La proteína PmeR tiene un peso molecular aproximado de 25,5 kDa y fue la proteína predominante en la fracción soluble total (carril T). Durante la inyección y el lavado una pequeña parte de PmeR salió de la columna (carriles I y L), provocando una leve disminución del rendimiento de la purificación. Sin embargo, una cantidad considerable de la proteína PmeR quedó retenida en la columna junto con otras proteínas, que se eluyeron tras aplicar un gradiente de cloruro sódico. Para la segunda cromatografía se seleccionaron las fracciones en las que la banda correspondiente a PmeR era mayoritaria (fracciones B12 a B9 y B8 a C1, Figura 22A).

Las fracciones seleccionadas se agruparon, se concentraron y se dializaron. A continuación se llevó a cabo una cromatografía de exclusión molecular que permitió separar la proteína PmeR de otras proteínas de distinto peso molecular, obteniéndose fracciones en las que PmeR era la proteína mayoritaria (Figura 22B). Algunas de las fracciones obtenidas se reunieron en dos grupos: el grupo 1 (fracciones D9 a E8), en el cual la proteína PmeR estaba presente en mayor cantidad pero contenía otras proteínas de distinto peso molecular, y el grupo 2 (fracciones E9 a F8), donde la proteína PmeR presentaba una mayor pureza. Las fracciones reunidas en los dos grupos se concentraron y dializaron

en tampón de almacenamiento, obteniéndose una pureza mayor en el grupo 2 (Figura 21C), razón por la cual se utilizó posteriormente en los ensayos *in vitro*.

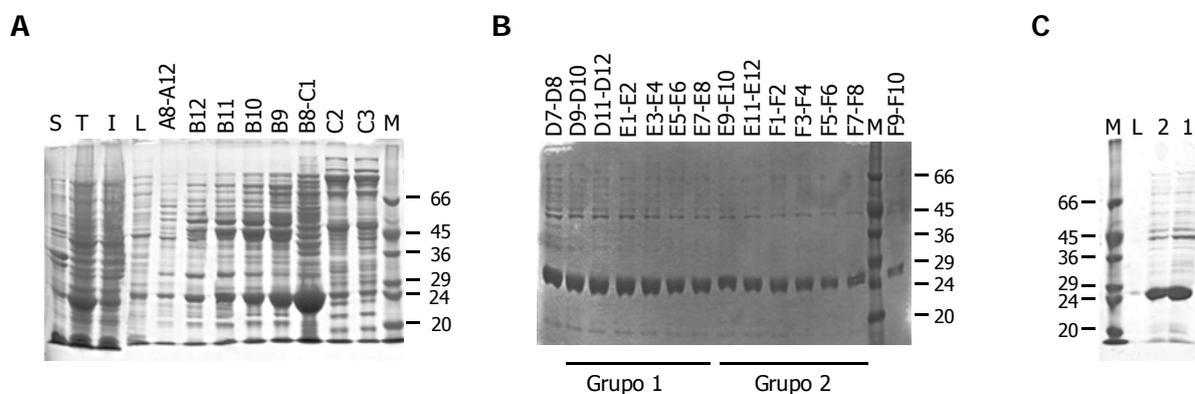


Figura 22. Perfil de proteínas de las fracciones obtenidas durante la purificación de PmeR.

Las fracciones se analizaron mediante electroforesis desnaturante SDS-PAGE al 10% (p/v) (A y C) y al 12,5% (p/v) (B). Junto a cada gel se indica en kDa los tamaños correspondientes al marcador de peso molecular (M).

A. Cromatografía en columna de heparina del extracto total. En el margen superior se indican las fracciones correspondientes: S, sedimento celular; T, extracto total soluble inyectado; I, fracción correspondiente a la inyección de la muestra; L, lavado de la columna; A8 a C3, fracciones correspondientes al pico de absorbancia de mayor intensidad obtenido al aplicar el gradiente de elución; M, marcador de peso molecular.

B. Cromatografía de exclusión molecular de las fracciones seleccionadas (B12 a C1 de 22A) tras someterlas a diálisis y concentrarlas. M, marcador de peso molecular. En la parte inferior se indican los grupos de fracciones escogidas para concentrar y dializar.

C. Fracciones reunidas de la cromatografía de exclusión molecular luego de concentrar y dializar en tampón de almacenamiento. M, marcador de peso molecular, L, lavado de la columna; 2, grupo 2 de proteína PmeR; 1, grupo 1 de proteína PmeR.

2.2. Estado de oligomerización de PmeR

Para analizar el estado de oligomerización de la proteína PmeR, se realizó una cromatografía analítica de exclusión molecular, utilizando una columna Superdex 200 (GE Healthcare), como se describe en la sección 7.3.3 de Materiales y Métodos. En primer lugar, se calibró la columna con proteínas globulares nativas de peso molecular conocido (Figura 23A) y a continuación se cargó la muestra de PmeR, obteniéndose un volumen de elución de 16,42 ml (Figura 23B). Esto corresponde a un peso molecular de 54,4 kDa que es un valor cercano al peso molecular de un dímero de PmeR, cuyo peso molecular teórico es de 25,53 kDa por monómero. No se detectó ningún pico correspondiente a la forma monomérica de PmeR, cuyo volumen de elución teórico habría sido de 18,75 ml.

Los resultados indican que la proteína PmeR en su estado nativo es un dímero en solución, al igual que otras proteínas pertenecientes a la familia TetR caracterizadas hasta el momento, como TetR, QacR, CprB o AcrR (Grkovic *et al.*, 1998; Natsume *et al.*, 2004; Orth *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2007).

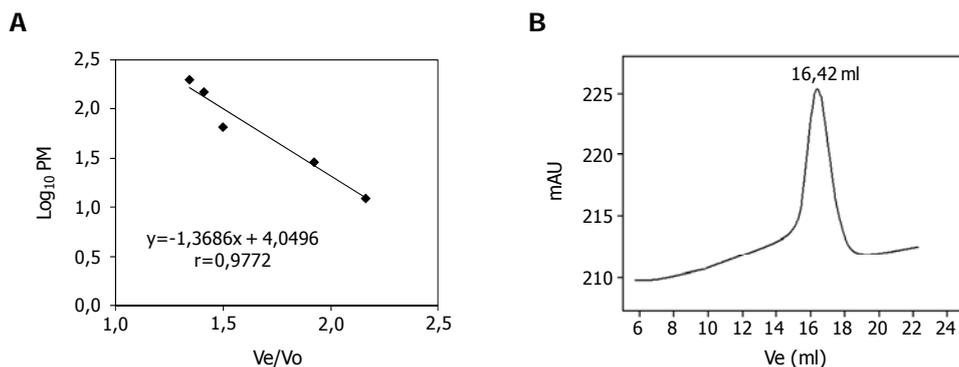


Figura 23. Cromatografía analítica de la proteína PmeR.

A. Curva de calibración de la columna de exclusión molecular Superdex 200 10/300GL (GE Healthcare) con proteínas patrón (β -amilasa, 200 kDa; alcohol deshidrogenasa, 150 kDa; albúmina de suero bovina, 66 kDa; anhidrasa carbónica, 29 kDa y citocromo C oxidasa, 12,4 kDa). En la relación V_e/V_o , V_o corresponde al volumen de elución del azul de dextrano y V_e es el volumen de elución de cada proteína.

B. Perfil de elución de la proteína PmeR pura. Se indica su correspondiente volumen de elución en ml para el pico observado (16,42 ml). Se inyectaron 200 μ l de PmeR a 1,06 mg/ml (40 μ M); mAU, unidades arbitrarias de absorbancia a 280 nm detectada durante la cromatografía.

2.3. Caracterización funcional de la unión de PmeR al ADN

Los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* demostraban que PmeR reprime la transcripción del operón *mexAB-oprM* y de su propio gen (apartado 1.3.4). La orientación divergente de los promotores de estos genes y su solapamiento permitía plantear la hipótesis de un mecanismo de represión común ejercido por PmeR al unirse a la región intergénica *pmeR-mexAB-oprM*, como otros reguladores transcripcionales de la familia TetR. Con el fin de demostrar la unión de PmeR al ADN, se utilizó un fragmento de ADN de 263 pb marcado (ver sección 7.8 y 7.9 de Materiales y Métodos) que abarcaba la región intergénica *pmeR-mexA* y, por tanto, las dos regiones promotoras. Inicialmente, se establecieron las condiciones para la unión de PmeR a su ADN diana *in vitro* mediante ensayos de retardo en gel, lo que permitió la determinación de la afinidad de PmeR por su región operadora. Una vez establecidas las condiciones óptimas de esa unión, se utilizó el mismo fragmento de ADN en ensayos de *footprint* para determinar la secuencia del sitio de unión y las bases importantes para el reconocimiento por PmeR.

2.3.1. Unión específica de PmeR a la región intergénica *pmeR-mexA*

En los ensayos de retardo en gel se detectó la unión de PmeR al fragmento de ADN que contenía la región intergénica *pmeR-mexA* (Figura 24A). Se observó una banda de ADN retardada únicamente en presencia de PmeR, lo que corresponde a un solo tipo de complejo PmeR/ADN. Además, su intensidad incrementó al aumentar la concentración de PmeR en la reacción de unión. Cabe señalar

también que solo la adición a la mezcla de unión del mismo ADN competidor no marcado, y no un exceso de ADN inespecífico, fue capaz de alterar la formación de este complejo, lo que permite confirmar que la unión observada en este ensayo es específica (no mostrado).

La cuantificación de las bandas correspondientes al ADN libre y unido en los ensayos de retardo permitió determinar la afinidad de PmeR por ese fragmento de ADN. Para ello se consideró el ADN como la macromolécula principal y PmeR (dímero) como el ligando, ya que se había demostrado anteriormente que se trata de una proteína homodimérica (véase apartado 2.2). Al representar el porcentaje de ADN unido frente a la concentración de PmeR utilizada en la mezcla de unión, se pudo determinar la constante de afinidad aparente, que resultó ser de 7 nM. (Figura 24B)

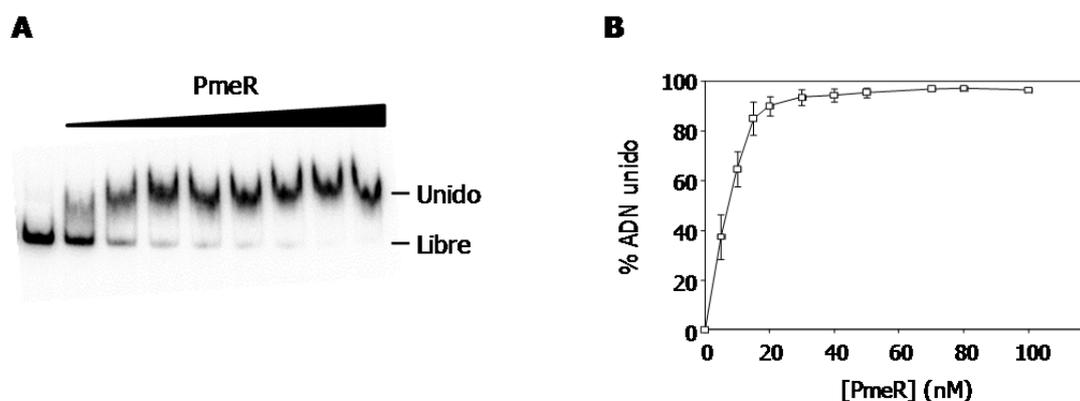


Figura 24. Unión específica *in vitro* del represor PmeR a la región intergénica *pmeR-mexA*.

A. Los ensayos de retardo en gel se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos (sección 7.8): el fragmento de ADN de 263 pb que abarca la región intergénica *pmeR-mexA* (1 nM) se incubó sin (carril 1) y con concentraciones crecientes de la proteína PmeR nativa (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 y 80 nM), en 10 μ l de tampón de unión y en presencia de ADN inespecífico (poli dI-dC, 15 μ g/ml) y BSA (200 μ g/ml).

B. Cuantificación de la unión de PmeR a la región intergénica *pmeR-mexA*. En el eje y se representa el porcentaje de ADN unido y en el eje x, la concentración de PmeR (dímero) presente en el ensayo. Las bandas de ADN libre y unido se cuantificaron para cada carril con el programa *Quantity One* (Bio-Rad). Los resultados mostrados corresponden a la media de cuatro experimentos diferentes con su desviación estándar.

2.3.2. Determinación del operador de PmeR en la región intergénica *pmeR-mexA*

Para determinar el sitio de unión de PmeR (operador) en la región entre *mexAB-oprM* y *pmeR* se llevaron a cabo dos tipos distintos de ensayos de *footprint* de protección con el mismo fragmento de ADN utilizado en los ensayos de retardo.

El análisis del *footprint* de protección frente a DNasa I (Figura 25A) reveló que PmeR protege una única región de 28 pb que cubre las dos regiones promotoras solapantes: de -38 a -11 en la cadena de *mexA* y de -11 a +17 en la cadena de *pmeR*; es decir, PmeR protege las regiones -10 de P_{mexA} y P_{pmeR} y la región -35 de P_{mexA} (Figura 25C). Esta disposición del sitio de unión de PmeR permite la represión

Para determinar los nucleótidos G críticos para la unión de PmeR a su operador se realizaron ensayos de *footprint* de protección frente a dimetilsulfato (DMS) (Figura 25B). El DMS es un agente metilante que reacciona con el N-7 de las guaninas orientadas hacia el surco mayor de la doble hélice de ADN (Carey y Smale, 2007; Helbl *et al.*, 1995). Por tanto, en este tipo de *footprint* cada guanina protegida indica un posible contacto y/o un punto de fuerte proximidad entre el ADN y la proteína en el surco mayor del ADN. En la hebra superior (*mexA*) las bases G -18 y -22 estaban protegidas por la unión de PmeR, mientras que la base A -10 mostró hiperreactividad, probablemente como consecuencia de su hipermetilación. En la hebra inferior (*pmeR*) se determinaron un mayor número de nucleótidos importantes para la unión de PmeR a su operador: G +12, + 8, +5 y +4, observándose también en esta hebra que la base A +18 estaba hipermetilada.

En general, la protección debida a la unión de PmeR indica que los contactos más íntimos se producen en el centro del operador y guardando cierta simetría (Figura 25C). La hipermetilación de los nucleótidos A -10 y +18 podría indicar una distorsión del ADN en estas zonas, probablemente debida a que la interacción de PmeR con su operador provoca cambios importantes en la conformación de la doble hélice de ADN que se hacen más evidentes en los límites del operador, convirtiéndose en zonas más accesibles al DMS.

2.4. Caracterización funcional de la unión de PmeR a sus efectores

Los resultados obtenidos, tanto *in vivo*, donde la expresión basal de *mexAB-oprM* y *pmeR* aumenta en un mutante carente de PmeR, como *in vitro* en los ensayos de *footprint*, muestran que PmeR reprime de manera coordinada la expresión del operón *mexAB-oprM* y su propia expresión al unirse a su operador que solapa con ambas regiones promotoras. Asimismo, PmeR está implicado en la inducción de la expresión de la bomba y de su propio gen en respuesta a algunos compuestos que actúan como inductores, entre los que se encuentran antibióticos, compuestos aromáticos y polifenoles de origen vegetal de tipo flavonoide (Figura 17). Por tanto, todos los resultados obtenidos, así como los mecanismos descritos para otros represores de la familia de TetR, sugerían un mecanismo de inducción de la expresión génica mediante desrepresión mediada por efector.

Con el fin de comprobar esta hipótesis y determinar si los sustratos de la bomba de eflujo podían inhibir la unión de PmeR a su operador, se realizaron ensayos de retardo en gel utilizando en la reacción una concentración fija de PmeR (50 nM), suficiente para el retardo completo de la sonda (Figura 24A) y añadiendo diferentes sustratos de la bomba: antibióticos, biocidas y flavonoides. Los resultados indican que los antibióticos ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina no inhibieron la unión de PmeR a su operador (Figura 26A), lo que coincide con los ensayos *in vivo*, en los que no se observó un

aumento de la expresión en respuesta a estos antibióticos (Figura 17). Sin embargo, todos los flavonoides ensayados inhibieron la unión de PmeR a su operador, aunque en diferente grado: morina, naringenina, quercetina y floretina fueron los mejores inhibidores, ya que, en su presencia, solo se observó una única banda correspondiente al ADN libre, mientras que (+)-catequina y floridzina tuvieron un efecto moderado (Figura 26A). Además, los biocidas butilparabeno y metilparabeno, impidieron claramente la unión de PmeR a la región intergénica *pmeR-mexA*.

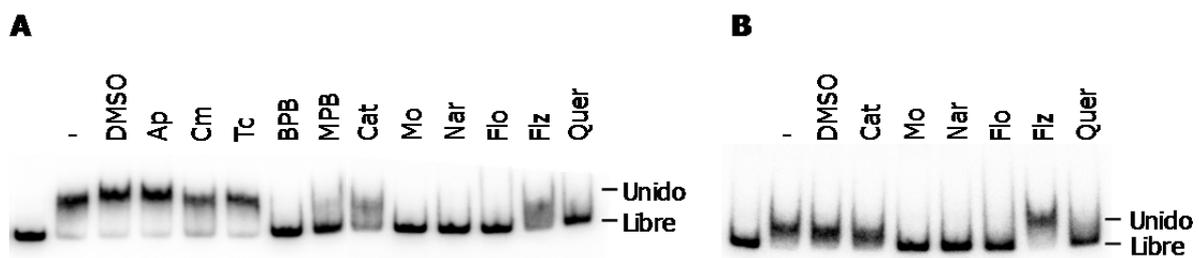


Figura 26. Efecto de diferentes sustratos de la bomba MexAB-OprM sobre la unión de PmeR a su operador.

Ensayos de retardo en gel con el fragmento de ADN de 263 pb (1 nM), en ausencia (calle 1) o presencia de PmeR (50 nM, calles siguientes), y en ausencia (calles 1 y -) y presencia de 1 mM de diferentes antibióticos [ampicilina (Ap), cloranfenicol (Cm) y tetraciclina (Tc)], biocidas [butilparabeno (BPB) y metilparabeno (MPB)] y flavonoides [(+)-catequina (Cat), morina (Mo), naringenina (Nar), floretina (Flo), floridzina (Flz) y quercetina (Quer)]. Algunos compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), por lo que se utilizó como control. A la derecha del panel se indica la altura de la banda correspondiente a ADN libre o unido a PmeR.

A. Inhibición de la formación del complejo PmeR/operador. Los ensayos de retardo en gel se realizaron como se describe en Materiales y Métodos, con la particularidad de que los compuestos se añadieron a la reacción desde el principio (junto con el ADN y la proteína).

B. Disociación del complejo PmeR/operador. Los ensayos de retardo en gel se realizaron como en A, excepto que los compuestos se añadieron 10 minutos después de la incubación de PmeR con el fragmento de ADN.

Para comprobar si los flavonoides que inhibían la unión de PmeR también podían promover la disociación del complejo PmeR-ADN *in vitro*, se realizaron los ensayos de retardo añadiendo los efectores 10 minutos después de la incubación de PmeR con el ADN. Todos los flavonoides ensayados, excepto floridzina y (+)-catequina, provocaron la disociación del complejo ADN-proteína, liberando de esta manera PmeR de la región operadora (Figura 26B).

Los resultados de los ensayos *in vitro* concuerdan con los obtenidos *in vivo* (Figuras 17 y 19), ya que los flavonoides naringenina y floretina y los biocidas butilparabeno y metilparabeno, que provocaron la disociación completa del complejo PmeR-ADN, también fueron los mejores inductores de la expresión de *mexAB-oprM* y *pmeR*, lo que sugiere que estos compuestos tienen un efecto significativo como moduladores de PmeR.

2.5. Regulación de *pmeR*

La disposición del operador de *PmeR* permite la represión simultánea de los promotores $P_{mexAB-oprM}$ y P_{pmeR} . Sin embargo, en ausencia de *PmeR* la expresión del regulador aumenta solo 1,5 veces, mientras que la expresión de la bomba lo hace aproximadamente 3 veces (Figura 19). Estos resultados sugieren la existencia de una regulación sobre *pmeR* adicional a la que ejerce el regulador. Con el fin de detectar alguna particularidad en la secuencia que pudiera sugerir otro tipo de control, se estudió en detalle la región aguas arriba de *pmeR*, identificándose una secuencia repetida e invertida (IR) particularmente larga entre +98 y +145; es decir, en la región líder del ARNm y próxima al primer ATG de *pmeR* (Figura 27A). Para determinar si dicha secuencia IR estaba también presente en otras bacterias, se buscó en las bases de datos y se alinearon las secuencias de las regiones intergénicas de distintas especies de *Pseudomonas* que portan los genes de la bomba (Figura 27B).

Se observó que, si bien las secuencias de la zona central de la región intergénica y, por tanto de los promotores, están conservadas, las secuencias previas a los ATGs del regulador y de la bomba difieren en *Pseudomonas* no pertenecientes al complejo *P. syringae* (Figura 27B). Sin embargo, la región situada antes del ATG de *pmeR* está muy conservada dentro de todas las cepas del complejo *P. syringae*, siendo diferente de la de las otras *Pseudomonas* utilizadas en el alineamiento, lo que sugiere que podría estar implicada en la regulación de *pmeR* y/o *mexAB-oprM* en distintas cepas de *P. syringae*. Resultados previos (Stoitsova *et al.*, 2008) indican que la bomba MExAB-OprM tiene la misma función en los patovares tomato DC3000, phaseolicola 1448A y *syringae* B728a: confiere resistencia a antibióticos y a compuestos antimicrobianos de distinto origen. Adicionalmente, en todos los casos, el gen regulador se encuentra aguas arriba del operón de la bomba y se transcribe en sentido opuesto (Figura 11). Curiosamente, en todas las cepas de *P. syringae* pv. tomato secuenciadas hasta el momento: DC3000 (Buell *et al.*, 2003), T1 (Almeida *et al.*, 2009), K40, NCPPB 1108 y Max13 (B.A. Vinatzer, no publicados) y en el patovar lachrymans cepa M302278 (Baltrus *et al.*, 2011), la región comprendida entre el gen similar a *pmeR* y la bomba de eflujo similar a *mexAB-oprM* es idéntica y la secuencia IR está presente (Figura 27B). No obstante, esta IR no está presente en otros patovares de *P. syringae* o en el patógeno del olivo *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

La homología de secuencia determinada en la región previa al ATG de *pmeR* y su +1 en los patovares de *P. syringae*, no se encontró en otras especies de *Pseudomonas* de amplia diversidad metabólica y nichos ecológicos diferentes a las del complejo *P. syringae*. No está presente en *P. fluorescens* Pf-5, que habita en la rizosfera de plantas y produce metabolitos secundarios que pueden inhibir patógenos de plantas en el suelo (Paulsen *et al.*, 2005), *P. fluorescens* Pf0-1, aislada de suelo (Compeau *et al.*, 1988; Silby *et al.*, 2009) o *P. fluorescens* A506 (Loper *et al.*, 2012; Wilson y Lindow,

1993), una cepa utilizada para el control del tizón del peral y del manzano. Tampoco se encontró en *P. entomophila*, una bacteria del suelo patógena para larvas y adultos de *Drosophila melanogaster* (Vodovar *et al.*, 2006), o en las diferentes cepas de *P. putida* que tienen bombas de eflujo similares a la de Pto DC3000, como *P. putida* KT2440, excelente colonizadora de raíz y utilizada como promotora del crecimiento de plantas (Nelson *et al.*, 2002), *P. putida* GB-1, aislada de agua dulce e implicada en la oxidación de manganeso, o *P. putida* DOT-T1E, degradadora de compuestos aromáticos como tolueno (Ramos *et al.*, 1995).

Para determinar si la secuencia IR encontrada en Pto DC3000, estaba presente en otras bacterias no pertenecientes al género *Pseudomonas*, se realizó una búsqueda de esta IR en distintas bases de datos, pero no se encontró la secuencia completa en otros genomas bacterianos.

Figura 27. Identificación de una secuencia repetida e invertida (IR) aguas arriba de *pmeR*. →

A. Secuencia de nucleótidos de la región intergénica *pmeR-mexA* en la que se indican resaltada en amarillo y con flechas la secuencia IR; con un punto, las posiciones -10 y -35 de P_{pmeR} y P_{mexA} ; los puntos de inicio de la transcripción en negrita y el sentido de la transcripción con una punta de flecha. Los codones de iniciación se muestran con letras huecas.

B. Alineamiento de secuencias de la región intergénica regulador-bomba de eflujo de diferentes *Pseudomonas*. Los residuos conservados en el 95% de las secuencias se muestran en rojo y los residuos conservados en el 60% de las secuencias en azul. Las regiones escogidas para el alineamiento abarcan desde el ATG de *pmeR* (CAT) hasta el ATG de *mexA*. Las secuencias provienen de genomas de *Pseudomonas* secuenciados y disponibles en las bases de datos NCBI y KEGG. Las líneas indican las secuencias -35 y -10 del promotor de *mexAB-oprM* y la punta de flecha el sentido de la transcripción.

2.5.1. Implicaciones de la secuencia IR en la expresión del promotor de *pmeR*.

La secuencia IR presente en la región líder de *pmeR* podría tener un papel en la regulación de la expresión de *pmeR*. Para estudiar esta posibilidad, se construyó el plásmido pPV2R-IR, en el que se clonó un fragmento con la región promotora de *pmeR* modificada tras suprimir la región IR, generando la fusión transcripcional $P_{pmeR-IR}::lacZ$, como se detalla en la sección 2.2 de Materiales y Métodos. Esta construcción se introdujo en la cepa Pto DC3000 y se determinó la expresión del promotor modificado midiendo la actividad β -galactosidasa en cultivos en LB a lo largo de la curva de crecimiento, tanto en ausencia como en presencia de floretina, el mejor inductor de la expresión de la bomba de eflujo y del regulador. En ausencia de floretina, la actividad basal del $P_{pmeR-IR}$ aumentó 3,5 veces con respecto a la actividad del promotor silvestre y su expresión se mantuvo constante a lo largo de la curva de crecimiento (Figura 28). En presencia de floretina, la expresión de $P_{pmeR-IR}$ aumentó 1,5 veces con respecto al nivel basal, un nivel de inducción similar al obtenido con el P_{pmeR} silvestre (Figura 28). Estos resultados indican que la IR parece inhibir la expresión de *pmeR*, ya que en su ausencia, aumenta. Es importante señalar que esa regulación es independiente de la presencia de floretina.

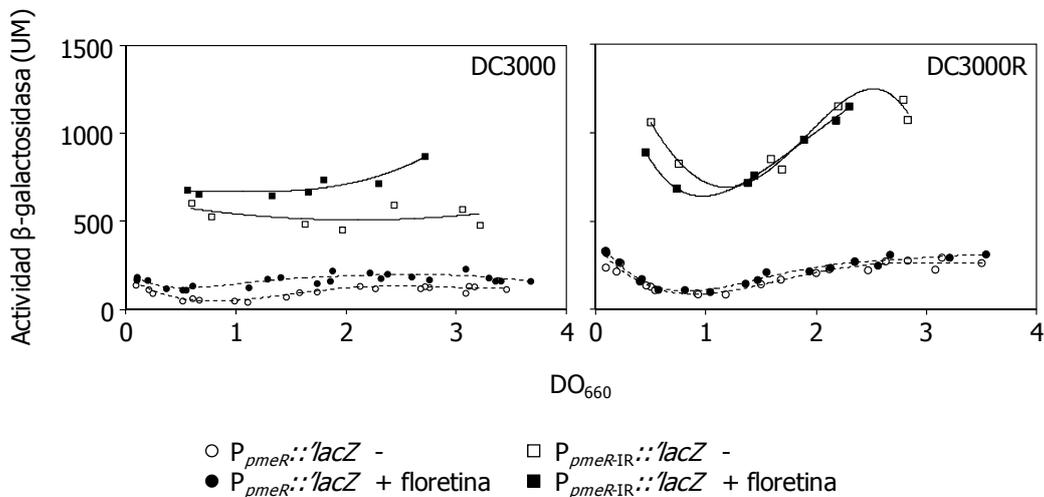


Figura 28. Efecto de la secuencia repetida e invertida (IR) sobre la expresión de *pmeR*.

La actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripcionales de los promotores *pmeR* (○) y *pmeR-IR* (□) se determinó en cultivos de las cepas DC3000 y DC3000R en ausencia (símbolos en blanco) o presencia (símbolos negros) de floretina 0,3 mM a lo largo de la curva de crecimiento. Los resultados mostrados incluyen los datos de 2 experimentos independientes.

Dado que la inactivación de *PmeR* provoca un incremento en la expresión basal de *pmeR* (Figura 19), se estudió la expresión de $P_{pmeR-IR}$ en el fondo mutante DC3000R. Los resultados obtenidos revelan que la expresión de P_{pmeR} aumenta en ausencia de la IR y, al igual que en el promotor silvestre, el incremento es independiente de la presencia de floretina (Figura 28). Además, se observó el mismo cambio en el patrón de expresión que en *pmeR* a lo largo de la curva de crecimiento. Estos resultados

demuestran que el control de la expresión de *pmeR* por la secuencia IR es también independiente de PmeR.

En resumen, la expresión de *pmeR* no solo está controlada por su producto génico, sino que además parece existir una regulación adicional dependiente de una IR presente en la región líder de su ARNm. Con estos resultados es difícil inferir a qué tipo de regulación está sujeto y será necesario profundizar en su análisis, pero todo parece apuntar a que se trata de una regulación a nivel postranscripcional.

3. Papel biológico del sistema PmeR/MexAB-OprM

3.1. Ensayos de infección en plantas de tomate

Las bacterias fitopatógenas poseen transportadores MDR similares a los presentes en bacterias que infectan a humanos y a animales, pero el papel de estos sistemas de transporte es tema de discusión (Martínez *et al.*, 2009; Piddock, 2006). Una vez establecido el modo de acción de PmeR sobre la expresión del operón *mexAB-oprM* y demostrado que algunos compuestos de origen vegetal actúan como inductores de la expresión de la bomba, nos planteamos que el sistema MexAB-OprM podía contribuir al proceso patógeno de Pto DC3000 y el mutante DC3000R tener alguna ventaja respecto a la cepa silvestre durante la infección de plantas de tomate. Para comprobar estas hipótesis se comparó el comportamiento de la cepa silvestre y los dos mutantes DC3000A y DC3000R en hojas de tomate, determinando la supervivencia y capacidad para multiplicarse en los tejidos tras la inoculación por aspersión con una solución bacteriana que contenía 10^6 ufc/ml.

El establecimiento inicial de las tres cepas se determinó a las 3 horas post-inoculación, observándose que era similar (entre $8,0 \times 10^3$ y $1,9 \times 10^4$ ufc/cm²). El tamaño de las poblaciones de Pto DC3000 y DC3000R alcanzó un máximo de $2,5 \times 10^7$ ufc/cm² de hoja de tomate, mientras que la población del mutante DC3000A fue 10 veces menor ($2,3 \times 10^6$ ufc/cm²). A los 2 dpi ya era posible observar diferencias en las tasas de crecimiento de Pto DC3000 y DC3000A, y a los 5 dpi el tamaño de las poblaciones de la cepa silvestre y los mutantes comenzó a disminuir aunque de forma diferente (Figura 29A).

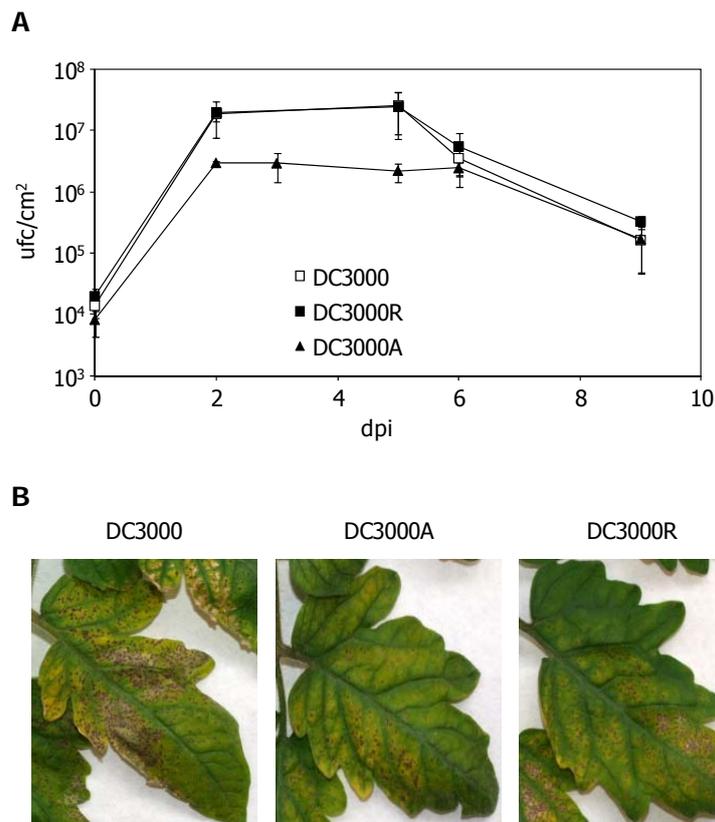


Figura 29. Evolución de las poblaciones bacterianas y desarrollo de síntomas en hojas de tomate.
A. Seguimiento del crecimiento en planta a lo largo del tiempo de las cepas de Pto DC3000, DC3000A y DC3000R. Se determinó el número de ufc/cm² en hojas de plantas de tomate 0, 2, 3, 5, 6, y 9 días después de la inoculación (dpi) artificial por pulverización con una solución bacteriana con aproximadamente 10⁶ ufc/ml. Los datos representan el promedio de cuatro experimentos diferentes con su desviación estándar.
B. Desarrollo de síntomas inducidos en folíolos de hojas de tomate 9 días después de la inoculación artificial por pulverización con DC3000, DC3000A y DC3000R.

Los síntomas de la enfermedad causada por el mutante deficiente en *pmeR* eran indistinguibles de los causados por la cepa silvestre o el mutante DC3000A y fueron consistentes con el tipo de lesión generada por Pto (Preston, 2000). En primer lugar, aparecieron unas pequeñas lesiones acuosas que posteriormente, a los 2-3 dpi, se rodearon de un halo de clorosis. Estas lesiones pronto se convirtieron en puntos necróticos de color marrón, rodeados por un halo clorótico. Sin embargo y de acuerdo con la disminución observada en los tamaños de las poblaciones, los síntomas causados por el mutante DC3000A fueron menos abundantes y estaban retardados con respecto a los causados por las cepas DC3000 y DC3000R (Figura 29B).

Estos resultados indican que la pérdida del sistema MexAB-OprM provoca una disminución en la capacidad de Pto para colonizar las plantas de tomate. Sin embargo, la pérdida de *PmeR* no tuvo ningún efecto detectable en la capacidad de la bacteria para colonizar la planta y provocar síntomas.

3.2. Ensayos de competencia *in vivo*

3.2.1. Ensayos de competencia en medio de laboratorio

Se ha demostrado que algunos transportadores juegan un papel clave en la competencia de bacteria fitopatógenas con otras bacterias saprofitas y, por tanto, son importantes en el proceso de colonización de las plantas (Burse *et al.*, 2004b; Llama-Palacios *et al.*, 2002). Para estudiar si este era el caso del transportador MexAB-OprM, se realizaron ensayos de competencia entre la cepa silvestre y cada uno de los mutantes deficientes en la bomba de eflujo y en el regulador.

En primer lugar y para descartar que la pérdida del transportador MexAB-OprM o del regulador PmeR tuviese un efecto sobre el crecimiento de las cepas mutantes, se compararon las curvas de crecimiento con la de la cepa silvestre y se observó que eran similares (Figura 30).

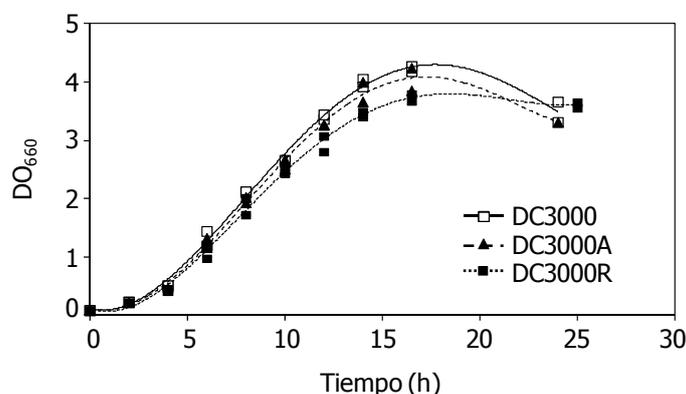


Figura 30. Curva de crecimiento de las diferentes cepas de Pto: DC3000, DC3000A, y DC3000R.

Las cepas de Pto se inocularon en medio líquido LB y se realizó seguimiento de su crecimiento midiendo su densidad óptica a 660 nm a lo largo del tiempo durante 25 horas. Los resultados mostrados corresponden a los datos de dos experimentos.

A continuación, se llevaron a cabo ensayos de competencia en medio líquido LB entre la cepa silvestre y los mutantes DC3000A y DC3000R inoculados en una proporción 1:1 (Figura 31). Este ensayo se realizó a dos títulos diferentes de inóculo inicial 10^4 ufc/ml (dosis baja) y 10^7 ufc/ml (dosis alta). Se observó que, después de 24 horas, la población del mutante DC3000A representaba el 24% de la población total cuando las cepas se inocularon a 10^4 ufc/ml, y el 43% cuando se inocularon a 10^7 ufc/ml. Por tanto, el mutante DC3000A resultó ser menos competitivo que la cepa silvestre al inocularse a dosis baja, pero no se observó competencia cuando las cepas se inocularon a dosis alta, probablemente porque las posibilidades de crecimiento estaban muy limitadas en este último caso. Sin embargo, la población del mutante DC3000R llegó a alcanzar el 37% de la población total cuando el inóculo inicial fue de 10^4 ufc/ml, y el 41% cuando el inóculo inicial fue de 10^7 ufc/ml, lo que significa que

el mutante deficiente en *pmeR* compete con la cepa silvestre de forma más eficiente que el mutante *mexA* en medio rico (Figura 31).

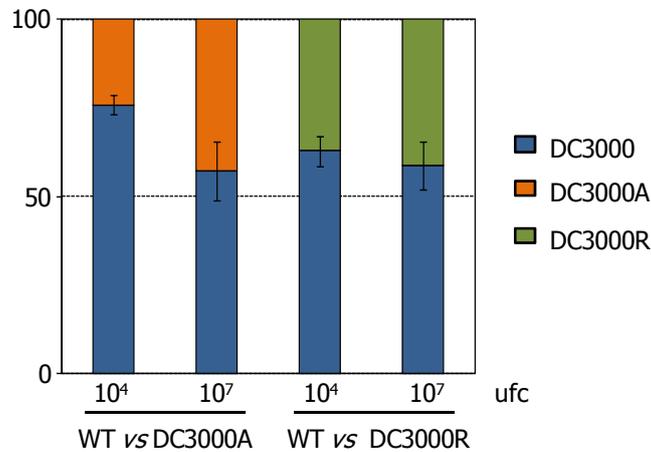


Figura 31. Ensayos de competencia en medio de laboratorio.

Para evaluar el efecto de la dosis de inoculación sobre el crecimiento bacteriano de DC3000 frente a DC3000A o DC3000R, se mezclaron las cepas en proporción 1:1, se añadieron a LB a dosis baja (10^4 ufc/ml) y a dosis alta (10^7 ufc/ml) y se cultivaron durante 24 horas a 28°C . Se realizaron entonces diluciones seriadas y se sembraron en placas de LB suplementadas con los antibióticos correspondientes para calcular la proporción relativa entre las cepas. Los resultados mostrados corresponden a las medias de cuatro experimentos independientes y las barras de error representan la desviación estándar.

3.2.2. Ensayos de competencia en plantas de tomate

A continuación, se evaluó la contribución del transportador MexAB-OprM y del regulador PmeR a la competencia en plantas de tomate. Para ello se inocularon las hojas por aspersión con una suspensión mixta con la misma proporción (1:1) de la cepa silvestre y mutante (DC3000A o DC3000R). Se tomaron muestras a las 3 horas post-inoculación para determinar el establecimiento inicial en el tejido foliar de la planta ($t=0$, aproximadamente 10^3 ufc/cm²), lo que permitió una cuantificación precisa de la posterior multiplicación de la población bacteriana. Se observó que ni el mutante de la bomba ni el mutante en el regulador presentaron deficiencias significativas en este paso, ya que la proporción de ambas poblaciones mutantes frente al total fue del 52% y 48%, respectivamente, valores similares a la proporción del 50% fijada en el inóculo inicial. A los 3 y 6 dpi se realizaron de nuevo recuentos de las cepas y en estos tiempos si se obtuvieron diferencias claras entre la cepa silvestre y el mutante DC3000A, ya que la población de DC3000A resultó ser el 40% de la total a 3 dpi y el 27% a 6 dpi (Figura 32). Sin embargo, la población de DC3000R se mantuvo en el 51% a 3 y 6 dpi (Figura 32), lo que indica que esta cepa compete eficientemente con la cepa silvestre en planta.

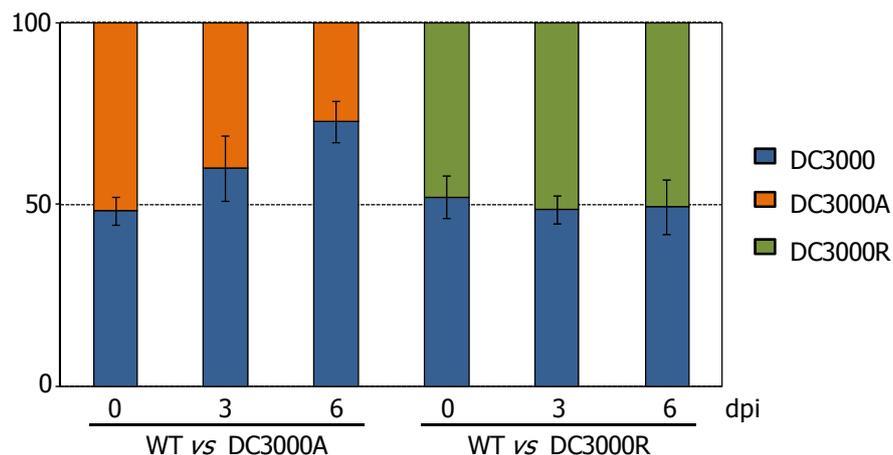


Figura 32. Ensayos de colonización competitiva de diferentes cepas de Pto en hojas de tomate.

Las hojas primarias de plantas de tomate se inocularon artificialmente por pulverización con una suspensión bacteriana ($\approx 8 \times 10^6$ ufc/ml) que contenía la misma proporción de la cepa silvestre y el mutante (DC3000A o DC3000R). La proporción inicial (0 dpi) entre las cepas se determinó en muestras tomadas de las hojas inoculadas 3 horas después de la pulverización. Asimismo, las bacterias se recuperaron de las hojas infectadas a 3 y 6 dpi, se hicieron diluciones seriadas y se sembraron en placas de LB suplementado con los correspondientes antibióticos para determinar el número de unidades formadoras de colonia por unidad de área (ufc/cm²). En los gráficos se representan las medias de cinco ensayos independientes con al menos tres plantas; las barras de error representan la desviación estándar.

Por tanto, la pérdida de MexAB-OprM provoca una disminución en la colonización de la planta huésped, efecto que se magnifica al competir con la cepa silvestre. La cepa carente de PmeR, sin embargo, se comportó de forma similar a la silvestre.

CAPÍTULO 2

EFFECTO DE LOS FLAVONOIDES EN FENOTIPOS RELEVANTES PARA LA BIOLOGÍA DE Pto DC3000

Dado que flavonoides como la floreitina y la naringenina inducen la expresión de la bomba de eflujo MexAB-OprM en Pto DC3000 y son sustratos de la misma, nos planteamos determinar si estos y otros sustratos de la bomba ejercían algún efecto sobre la fisiología del patógeno. En este capítulo se estudió el efecto de los flavonoides sobre la motilidad y la expresión del sistema de secreción tipo 3.

1. Efecto de los flavonoides sobre la motilidad de Pto DC3000

Para cuantificar las poblaciones bacterianas en las plantas infectadas, en nuestro laboratorio se toman muestras de las hojas utilizando un sacabocados y el tejido se homogeniza mediante percusión mecánica. A partir del macerado, se realizan diluciones seriadas que se siembran en gotas en placas de LB, para posteriormente contar las unidades formadoras de colonias y establecer el título de la población. En las diluciones más bajas, se observó que las bacterias se desplazaban solamente cuando alcanzaban el borde de la gota (Figura 33), por lo que pensamos que compuestos presentes en el extracto de la planta podrían estar inhibiendo ese comportamiento.

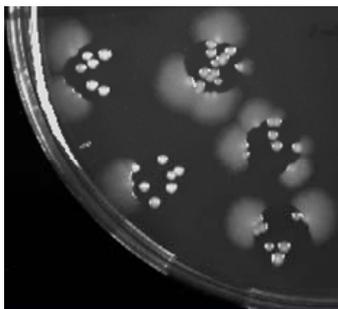


Figura 33. Efecto de los extractos vegetales en la motilidad de Pto DC3000.

Las bacterias se recuperaron a partir de hojas de tomate infectadas tras homogenizar el tejido y sembrar diluciones seriadas en placas de LB. Tras incubarlas 48 horas a 25°C, se observó el movimiento de las bacterias alrededor de la gota en las diluciones más bajas.

Dado que la motilidad tiene un papel importante en la colonización y diseminación de las bacterias en sus nichos, nos planteamos determinar el efecto de diferentes compuestos vegetales sobre la motilidad de Pto DC3000, evaluando dos tipos de movimiento: *swimming* y *swarming*.

1.1. Motilidad tipo *swimming*

El movimiento de tipo *swimming* es el desplazamiento individual de bacterias en medios líquidos o viscosos que nadan gracias al movimiento de su(s) flagelo(s) (Kearns, 2010). Numerosas cepas de *P.*

syringae se mueven de este modo en medios con baja concentración de agar (Shimizu *et al.*, 2003; Toutain *et al.*, 2005).

1.1.1. Ensayos de motilidad tipo *swimming* en medio rico LB

En LB (0.3% agar) se observan halos de dispersión de Pto DC3000 a partir del punto de inoculación que crecen en tamaño con el tiempo (Figura 34). Al ensayar la motilidad en presencia de diferentes compuestos (antibióticos y flavonoides), se observó que los flavonoides fletina y morina provocaban una reducción de la motilidad, de modo que los diámetros de los halos de *swimming* eran un 18% y 17% menores, respectivamente, que los observados en ausencia de compuesto (Figura 35 y 36). Se utilizó DMSO como control para verificar que la disminución en la motilidad se debía al flavonoide y no al disolvente. En presencia de cloranfenicol (a 0,3 y 0,5 ug/ml) el diámetro del halo también disminuyó entre un 15 y un 20%, respectivamente.

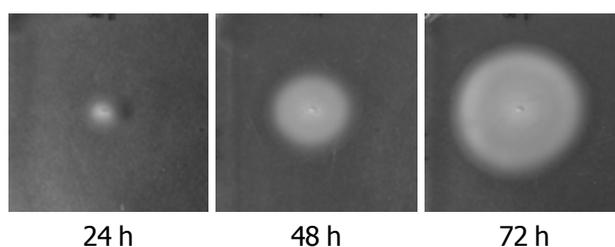


Figura 34. Motilidad tipo *swimming* en de Pto DC3000.

4x10⁶ células de DC3000 se inocularon en placas de LB (0,3% agar) como se describe en la sección 4.4.1 de Materiales y Métodos. Las placas se incubaron a 25°C y las fotografías se tomaron a las 24, 48 y 72 horas.

Los resultados mostrados en el Capítulo 1 demuestran que esos flavonoides son sustratos de la bomba MexAB-OprM y los mejores efectores del represor PmeR. Para verificar el efecto de dichos compuestos en la motilidad tipo *swimming*, se comparó el comportamiento de la cepa silvestre con los mutantes DC3000A y DC3000R en ausencia y en presencia de los mismos. Los resultados indican que la motilidad se redujo drásticamente en la cepa mutante DC3000A, no sólo en presencia de los flavonoides fletina (50%), morina (21%) y naringenina (33%), sino de otros sustratos de la bomba, como el cloranfenicol (29%) (Figura 35). En el caso de la naringenina el efecto de la concentración ensayada sobre el *swimming* fue más evidente en la cepa DC3000A que en la silvestre. Por su parte, la cepa DC3000R se comportó de forma similar a la silvestre, tanto en ausencia como en presencia de compuestos.

La complementación de los mutantes DC3000A y DC3000R con los plásmidos pMEX y pPV4R, que portan el operón completo *mexAB-oprM* y el gen *pmeR*, respectivamente, dio lugar a un fenotipo similar al de la cepa silvestre (Figura 36).

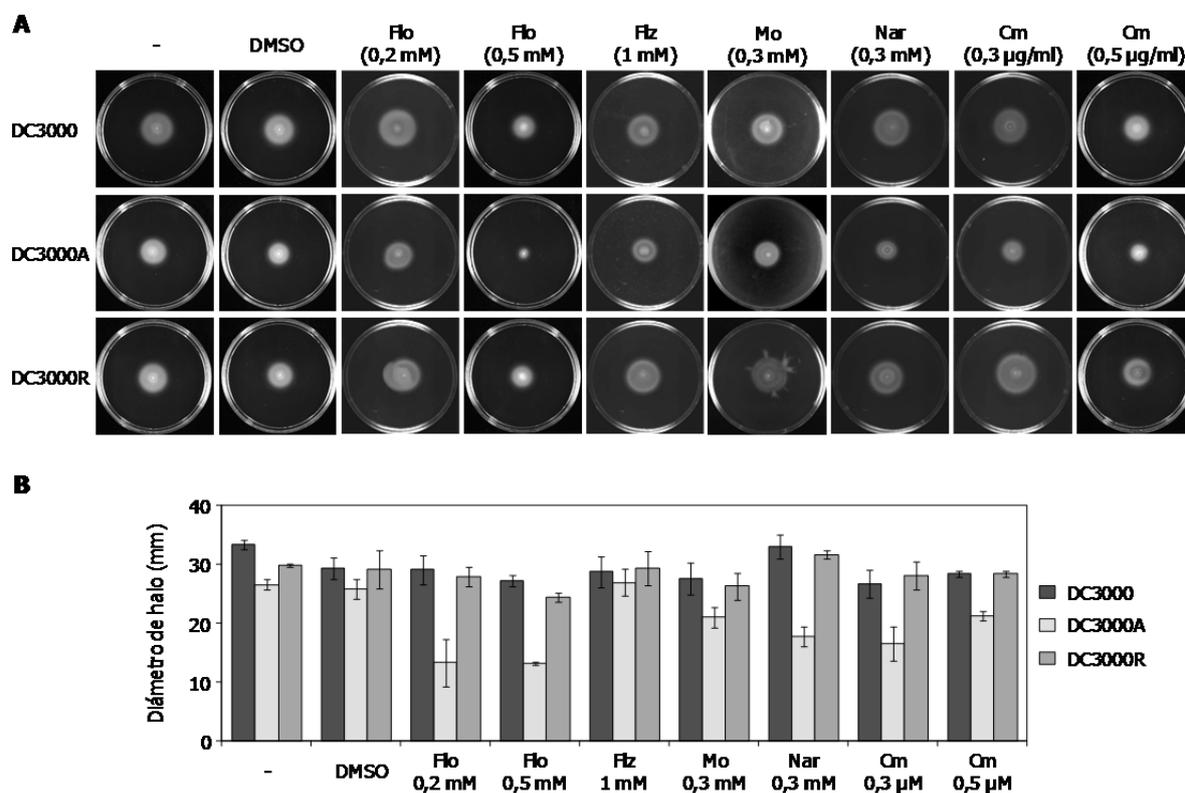


Figura 35. Efecto de los flavonoides sobre la motilidad tipo *swimming* en cepas de Pto.

A. El ensayo de motilidad tipo *swimming* se realizó en placas de LB (0,3% agar) como se describe en Materiales y Métodos. Las placas se inocularon con 4×10^6 células de las cepas indicadas y se incubaron a 25°C durante 48 horas en ausencia (-) y presencia de DMSO (8,4 mM), floretina (Flo), floridzina (Flz), morina (Mo), naringenina (Nar) y cloranfenicol (Cm) a las concentraciones indicadas.

B. Diámetro de halo de motilidad. Los diámetros se midieron para cada cepa y condición tras 48 horas de incubación. Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

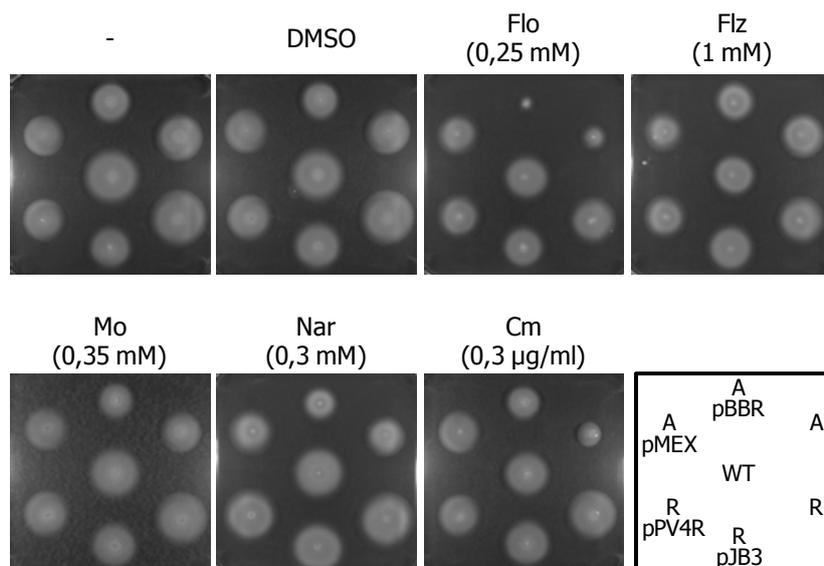


Figura 36. Ensayos de motilidad tipo *swimming* en mutantes de Pto complementados.

4x10⁶ células de las cepas DC3000 (WT), DC3000A (A), DC3000A con pBBR1MCS (A pBBR), DC3000A con pMEX (A pMEX), DC3000R (R), DC3000R con pJB3Tc19 (R pJB3) y DC3000R con pPV4R (R pPV4R), se inocularon en placas de medio semisólido LB. Las fotos se realizaron tras incubar las placas a 25°C durante 48 horas en ausencia (-) y presencia de DMSO (8,4 mM), floretina (Flo), floridzina (Flz), morina (Mo), naringenina (Nar) y cloranfenicol (Cm) a las concentraciones indicadas. Se muestran las imágenes representativas de tres experimentos independientes.

1.1.2. Ensayos de motilidad tipo *swimming* en medio mínimo MMF

Dado que los flavonoides son metabolitos secundarios de plantas y muchos de ellos se sintetizan en respuesta al ataque de patógenos (Dixon, 2001; Osbourn, 1996), consideramos interesante determinar si esos compuestos podían ejercer el mismo efecto en un medio de cultivo que simula el apoplasto vegetal. Por tal razón se utilizó el medio mínimo MMF, que se caracteriza por presentar una baja disponibilidad de nutrientes, un pH ácido y tener fructosa como fuente de carbono (Huynh *et al.*, 1989).

Se evaluó la motilidad tipo *swimming* en medio MMF semisólido (con 0,3% agar), en ausencia y en presencia de floretina. Tanto en la cepa Pto DC3000 como en el mutante carente de la bomba MexAB-OprM (DC3000A), se observó una disminución en motilidad del 50 y 70%, respectivamente, en presencia de floretina (Figura 37). Cabe resaltar que en este medio la floretina tiene un mayor efecto sobre las dos cepas en comparación con lo observado en LB semisólido (Figura 35).

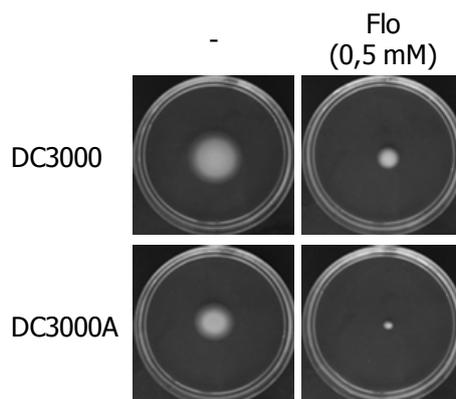


Figura 37. Efecto de la floretina en la motilidad tipo *swimming* en medio mínimo MMF.

4×10^6 células de las cepas Pto DC3000 y DC3000A se inocularon en el centro de placas sin (-) y con floretina 0,5 mM y se incubaron a 25°C durante 7 días. El ensayo se repitió tres veces obteniendo los mismos resultados.

1.2. Motilidad tipo *swarming*

La motilidad tipo *swarming* es un movimiento rápido (2-10 $\mu\text{m/s}$) y coordinado de una población bacteriana sobre superficies sólidas o semisólidas. Es un comportamiento multicelular que se ha observado principalmente en condiciones de laboratorio controladas y depende de dos elementos críticos: la composición y la viscosidad del medio de cultivo. Las bacterias que realizan *swarming* sufren una diferenciación morfológica que las distingue de las que se encuentran en estado planctónico: las células localizadas en el frente de migración suelen estar hiperelongadas, hiperflageladas y se agrupan en estructuras multicelulares formando empalizadas (Kearns, 2010).

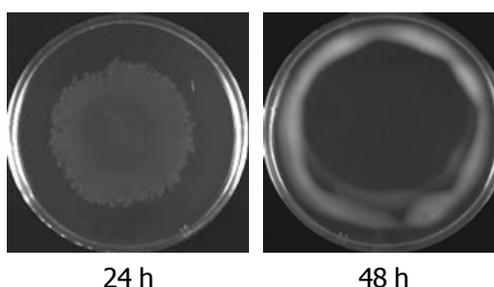


Figura 38. Motilidad tipo *swarming* en de Pto DC3000.

4×10^6 células de DC3000 se inocularon en la superficie de placas de PG-Agar como se describe en Materiales y Métodos (sección 4.4.2) y se incubaron a 25°C. Las fotografías se tomaron a las 24 y 48 horas.

Pto DC3000 presenta un movimiento de tipo *swarming* muy rápido en medios ricos con baja concentración de agar, pero no en medios mínimos, como MMF (no mostrado). En PG-agar (0.5%) se observan halos de dispersión desde el punto de inoculación que crecen en tamaño con el tiempo y alcanzan el borde de las placas de 80 mm de diámetro a las 40-48 horas (Figura 38). Al llevar a cabo el

mismo ensayo con la cepa silvestre pero en presencia de diferentes compuestos (antibióticos, flavonoides y biocidas), se observó una marcada disminución de la motilidad tipo *swarming* en presencia de flavonoides como floretina, morina o naringenina, en presencia de antibióticos como cloranfenicol y de biocidas como butilparabeno y metilparabeno (Figura 39). Es decir, se observa que, al igual que ocurría con la motilidad tipo *swimming*, determinados sustratos de la bomba MexAB-OprM reducen la motilidad *swarming* en Pto DC3000.

Asimismo, el efecto de los flavonoides resultó más pronunciado en el mutante DC3000A, ya que su motilidad en superficie se redujo fuertemente en presencia de todos los compuestos ensayados; de hecho, no se observó *swarming* en presencia del biocida metilparabeno (Figura 39). Sin embargo, este movimiento se restauró parcialmente en la cepa complementada con el plásmido pMEX, que portaba el operón *mexAB-oprM* (Figura 40).

En el mutante DC3000R, la motilidad *swarming* fue mayor que la de la cepa silvestre, tanto en ausencia como en presencia de todos los compuestos ensayados (Figura 39). Esta diferencia no se observó en los ensayos de *swimming* y pudiera deberse a que DC3000R es más resistente a estos compuestos (Tabla 14) debido a la sobreexpresión de la bomba como consecuencia de la ausencia del represor. De todos modos, al complementar la cepa con el plásmido pPV4R, que porta el gen *pmeR*, se restauró el fenotipo silvestre (Figura 40).

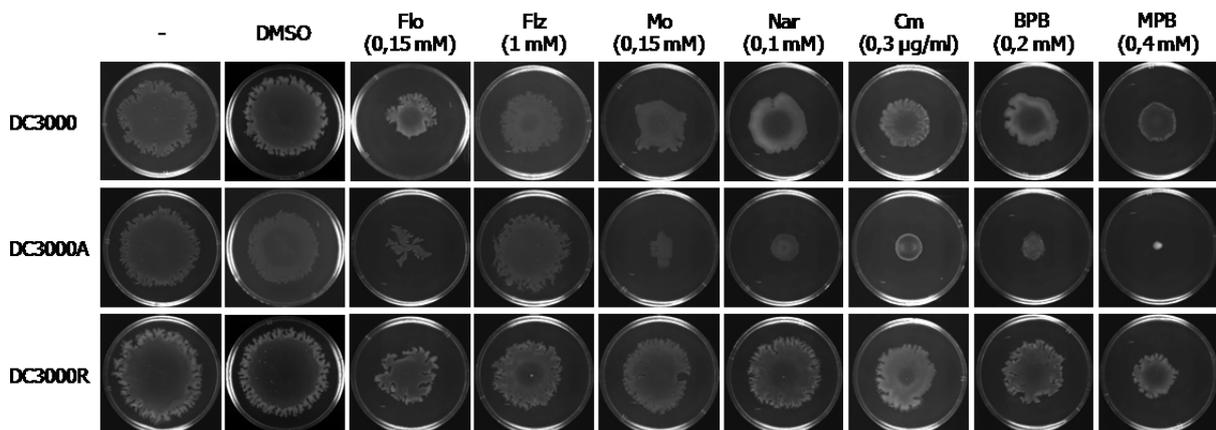


Figura 39. Ensayos de motilidad tipo *swarming* en cepas de Pto.

Placas de medio semisólido PG-agar se inocularon en superficie con 4×10^6 células de las cepas indicadas y se incubaron 24 horas a 25°C. El ensayo se realizó en ausencia (-) y presencia de DMSO (7 mM), floretina (Flo), floridzina (Flz), morina (Mo), naringenina (Nar), cloranfenicol (Cm), butilparabeno (BPB) y metilparabeno (MPB) a las concentraciones indicadas. Las fotografías son representativas de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes.

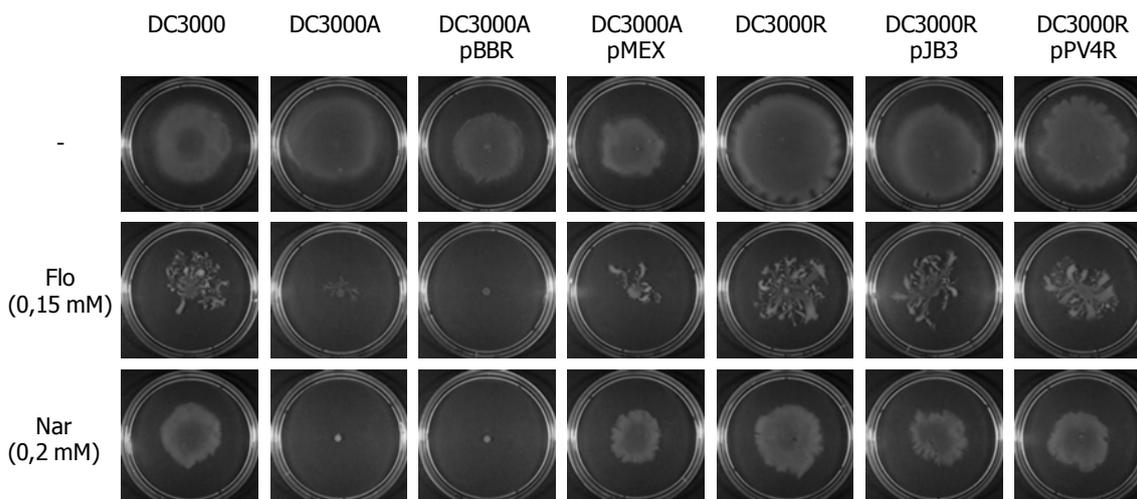


Figura 40. Ensayos de motilidad tipo *swarming* en mutantes de Pto complementados.

4x10⁶ células de las cepas DC3000, DC3000A, DC3000A con pBBR1MCS, DC3000A con pMEX, DC3000R, DC3000R con pJB3TC19 (pJB3) y DC3000R con pPV4R; se inocularon en la superficie de placas de PG-agar y se incubaron 24 horas a 25°C. Se muestran las imágenes representativas de tres experimentos independientes.

Los resultados mostrados en los apartados 1.1 y 1.2 de este capítulo indican que la motilidad tipo *swimming* y *swarming* disminuye en presencia de algunos flavonoides como floreтина, morina y naringenina, así como en presencia de cloranfenicol, butilparabeno y metilparabeno. Estos compuestos son sustratos de la bomba MexAB-OprM, lo que resulta interesante, ya que en el mutante carente de ésta la reducción de la motilidad es más evidente.

1.3. Implicación del flagelo en la reducción de la motilidad de Pto DC3000 en presencia de flavonoides

Estudios previos realizados en *P. syringae* indicaban que tanto el *swimming* como el *swarming* eran absolutamente dependientes de la motilidad flagelar, ya que un mutante carente de flagelina (Flc) permanecía inmóvil. Mutantes carentes de pili tipo IV, sin embargo, carecían de motilidad tipo *swarming* y presentaban una reducción en *swimming* (Shimizu *et al.*, 2003; Taguchi y Ichinose, 2011; Taguchi *et al.*, 2006). Para investigar si los flavonoides ejercen su acción sobre los pili tipo IV o sobre los flagelos, utilizamos un mutante carente de flagelina ($\Delta fliC$, previamente denominado $\Delta flaA$, Hu *et al.* 2001) y dos mutantes desprovistos de pili tipo IV ($\Delta pilA$ y $\Delta pilD$, Roine *et al.*, 1998), todos derivados de Pto DC3000 (Figura 41).

El mutante *fliC*, que no tiene flagelo, es inmóvil tanto en placas de *swimming* como de *swarming*, en ausencia o en presencia de floreтина. Por otra parte, la motilidad tipo *swimming* de los mutantes *pilA* y *pilD* se redujo aproximadamente un 20% con respecto a la cepa silvestre, pero su motilidad en

superficie fue diferente: fue mayor que en la cepa silvestre en el mutante *pilA* y menor en *pilD*. En cualquier caso, los flavonoides disminuyen los dos tipos de motilidad (Figura 41). Estos resultados sugieren que el flagelo es necesario para los movimientos tipo *swimming* y *swarming* en Pto DC3000, mientras que los pili parecen tener un papel accesorio. Además, los flavonoides parecen ejercer su efecto específicamente sobre el flagelo, ya que siguen inhibiendo tanto la motilidad tipo *swimming* como *swarming* en los mutantes carentes de pili tipo IV.

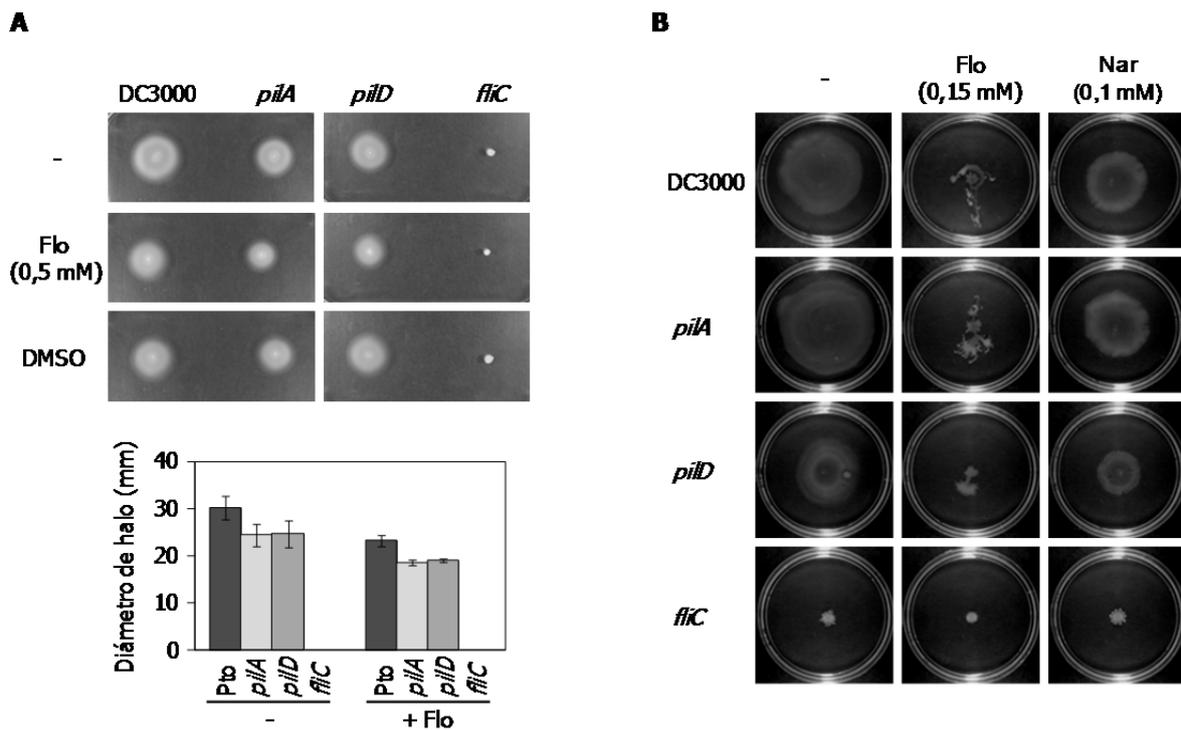


Figura 41. Ensayo de motilidad en mutantes de Pto carentes de flagelo y pili tipo IV.

Los ensayos de *swimming* y *swarming* se llevaron a cabo como se indica en la sección 4.4 de Materiales y Métodos. 4×10^6 células de las cepas indicadas se inocularon en los respectivos medios semisólidos y se incubaron a 25°C.

A. Ensayo de *swimming* en placas de LB con 0,3% (p/v) de agar incubadas durante dos días en ausencia (-) y presencia de DMSO (14 mM) y floretina (Flo) a la concentración indicada. En el panel inferior se muestran los diámetros del halo de *swimming* medidos a las 48 horas de placas sin y con floretina, los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

B. Ensayo de *swarming* en placas de PG-agar (0,5% agar) (p/v) tras 24 horas de incubación en ausencia (-) y presencia de floretina (Flo) y naringenina (Nar). Se muestran las imágenes representativas de tres experimentos independientes.

1.4. Relación entre motilidad y resistencia mediada por MexAB-OprM en Pto DC3000

Estudios recientes en *P. syringae* pv. *tabaci* han demostrado que mutantes defectuosos en motilidad, como una cepa carente de *fliC*, presentaba una mayor tolerancia a antibióticos debido a la sobreexpresión de la bomba de eflujo MexEF, perteneciente a la familia de transportadores RND

(Taguchi *et al.*, 2010). Asimismo, cepas desprovistas de pili tipo IV, necesarios para la motilidad tipo *swarming* en esta cepa, eran más resistentes a compuestos antimicrobianos debido a una mayor expresión de la bomba MexAB-OprM (Taguchi y Ichinose, 2011). Dada la relación entre motilidad y resistencia múltiple en *P. syringae* pv. tabaci y que la bomba MexAB-OprM de Pto DC3000 es responsable de la resistencia intrínseca a compuestos antimicrobianos de diversa naturaleza y estructura, nos propusimos investigar si mutaciones en el aparato flagelar o en genes implicados en la síntesis de pili tipo IV en DC3000 aumentaban la tolerancia frente a compuestos antimicrobianos. Para ello, se determinó la susceptibilidad de mutantes carentes de flagelos (*fleQ*, deficiente en el regulador maestro para la síntesis de los flagelos, y *fliC*, que no produce flagelina) o de pili tipo IV (*pilA* y *pilD*) a diferentes compuestos en comparación con la cepa silvestre mediante el ensayo de MIC (Tabla 15). El valor de MIC fue en todos los casos similar al de la cepa silvestre, con lo que podemos afirmar que en esos mutantes de Pto DC3000 deficientes en motilidad no se produce un aumento de la tolerancia a compuestos antimicrobianos.

Tabla 15. Susceptibilidad de la cepa Pto DC3000 y mutantes carentes de flagelo y pili tipo IV a diferentes compuestos antimicrobianos

Compuesto	MIC(µg/ml)				
	DC3000	<i>fleQ</i>	<i>fliC</i>	<i>pilA</i>	<i>pilD</i>
Ácido nalidíxico	8	8	8	8	8
Ampicilina	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5
Cefotaxima	3,9	3,9	3,9	3,9	3,9
Cloranfenicol	3,1	3,1	- *	3,1	3,1
Espectinomicina	7,8	7,8	-	- *	- *
Floretina	> 8571	> 8571	-	-	-
Gentamicina	0,25	0,13	0,25	0,25	0,25
Metilparabeno	594	594	594	-	-
Tetraciclina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

-, no determinado. * El antibiótico es el marcador de selección para el mutante.

Adicionalmente, se cuantificó la expresión del promotor del operón del transportador utilizando la fusión transcripcional $P_{mexAB-oprM}::lacZ$ y midiendo actividad β -galactosidasa en Pto DC3000 y en los mutantes, tanto en ausencia como en presencia de floretina, el mejor inductor del operón. En ningún caso varió de forma significativa la expresión de la bomba MexAB-OprM en los mutantes *fleQ*, *fliC*, y *pilA* con respecto a la obtenida en la cepa silvestre (Figura 42).

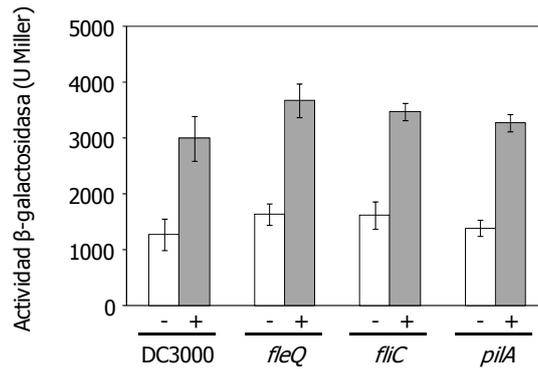


Figura 42. Expresión del promotor de *mexAB-oprM* en Pto DC3000, *fleQ*, *fliC* y *pilA*.

La actividad β -galactosidasa de la fusión transcripcional $P_{mexAB-oprM}::lacZ$ se determinó en cultivos crecidos a 25°C en LB hasta una DO_{660} de 0,5 en ausencia (-) y presencia de furofuran 0,3 mM (+). El gráfico muestra el promedio de tres experimentos independientes con su respectiva desviación estándar.

1.5. Efecto de los flavonoides sobre la abundancia de flagelos

En las condiciones ensayadas, hemos observado que los flavonoides reducen la motilidad tipo *swimming* y *swarming* probablemente actuando a nivel del aparato flagelar. Para determinar si la furofuran modificaba la cantidad de flagelos que presentaban las células, se visualizaron con el microscopio electrónico de transmisión (TEM) bacterias procedentes de distintos cultivos en medio rico LB y en medio mínimo MMF, tanto en ausencia como en presencia de furofuran.

Se observaron de uno a tres flagelos polares por célula en cultivos de Pto DC3000 en LB, como habían descrito previamente Roine *et al.* (1997) (Figura 43). Para la determinación del número de flagelos se contaron unas 200 células en diferentes campos, registrando la ausencia o presencia de flagelos asociados a la célula y su número. La cuantificación mostró que el 42% de las células de DC3000 presentaban entre 1 y 3 flagelos, mientras que en presencia de furofuran la cantidad de células flageladas disminuyó al 16% (Figura 43A). En el mutante DC3000A, el número de bacterias con flagelos se redujo drásticamente en comparación con la cepa silvestre incluso en ausencia de furofuran, ya que solo el 10% de las células presentaban de 1 a 3 flagelos (Figura 43A). La exposición a furofuran provocó una reducción mayor en el número de flagelos, de modo que casi el 100% de las células analizadas carecían de flagelos. En el mutante DC3000R, sin embargo, el número de bacterias flageladas fue similar al de DC3000 en ausencia de furofuran, pero significativamente mayor en presencia de este flavonoide, ya que el 29% de las células presentaban flagelos.

En cultivos de Pto DC3000 y sus mutantes en medio inductor MMF, las observaciones de TEM indican que, aunque el porcentaje de células flageladas fue mayor en MMF que en LB tanto en ausencia como en presencia de furofuran, el patrón de distribución y la morfología de los flagelos fueron similares a aquellos observados en LB (no mostrado).

También se determinó el efecto de los flavonoides sobre la abundancia flagelar en células en movimiento tomando muestras de placas de *swarming*, tanto en ausencia como en presencia de fletina, utilizando la tinción de Leifson y visualizándolas bajo el microscopio óptico (Materiales y métodos, sección 8.2). En este caso, Pto DC3000 portaba de dos a cinco flagelos polares (Figura 43B). No se observaron cambios en el número de flagelos que poseían la cepa silvestre y el mutante DC3000R en presencia de fletina. Sin embargo, la adición de fletina a las placas del mutante DC3000A provocó una reducción considerable en el número de flagelos (Figura 43B).

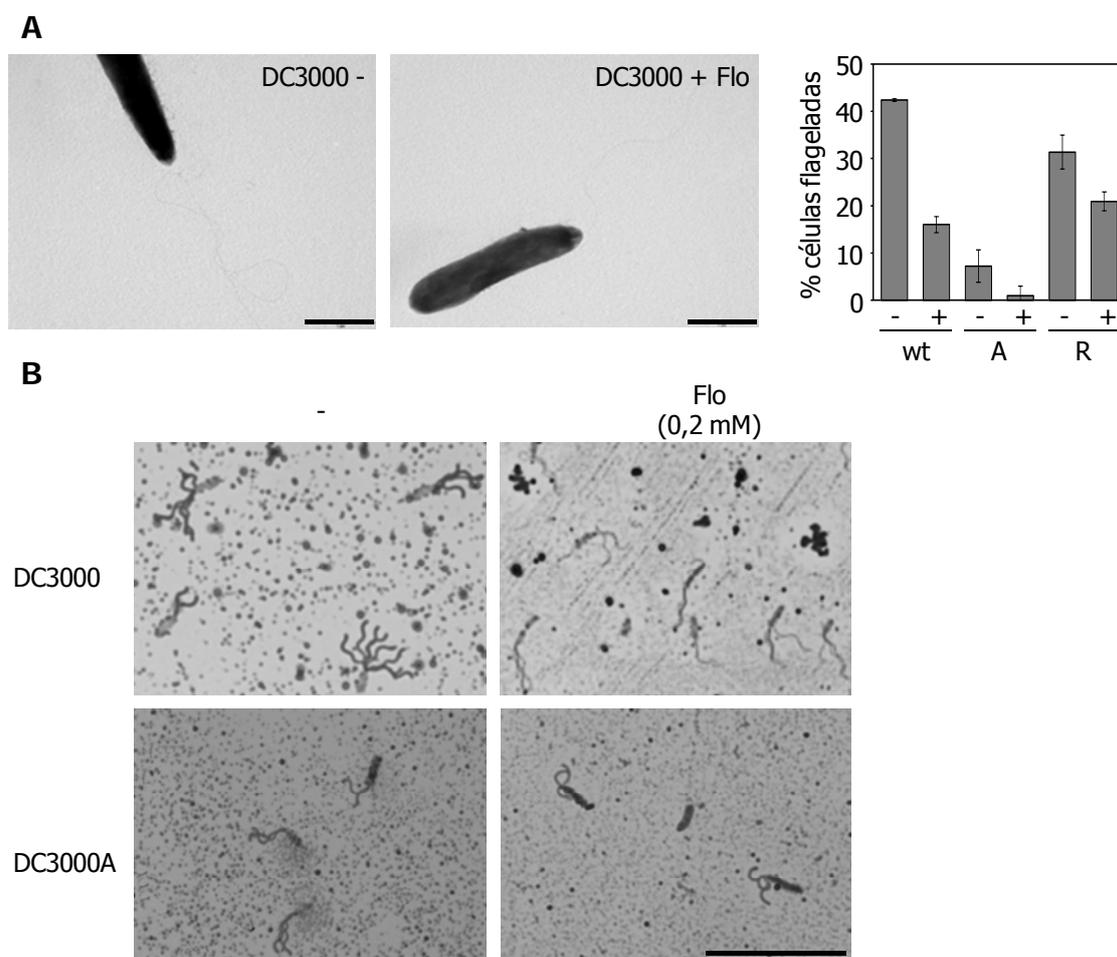


Figura 43. Influencia de la fletina sobre la abundancia de flagelos en Pto.

A. Visualización y cuantificación de células flageladas provenientes de cultivos líquidos en LB. Las cepas se cultivaron en ausencia y en presencia de fletina (0,3 mM) a 28°C hasta una DO_{660} de 0,5 y se prepararon para microscopía electrónica de transmisión (Materiales y métodos, sección 8.1). Las imágenes mostradas corresponden a la cepa silvestre, son representativas de todas las cepas utilizadas e ilustran la reducción en el número de flagelos con fletina. Las barras representan 1 μ m. El número de flagelos por célula se cuantificó en las imágenes de DC3000, DC3000A y DC3000R. Los valores mostrados en el gráfico representan el porcentaje de bacterias flageladas del total de células contadas (aproximadamente 200). Todos los experimentos se realizaron al menos dos veces con resultados similares.

B. Visualización de la abundancia flagelar en células *swarmers*. Fotografías obtenidas en el microscopio óptico de células teñidas con el método de Leifson a partir de placas de PG-agar sin (-) y con fletina (0,2 mM). La barra representa 5 μ m.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía revelaron que la exposición a flavonoides provoca una disminución en el número de células flageladas en cultivo líquido y una disminución en el número de flagelos en células con motilidad tipo *swarming*. Este efecto fue más evidente en el mutante DC3000A, que carece de la bomba MexAB-OprM y que acumula intracelularmente estos compuestos dada su incapacidad para eliminarlos (Vargas *et al.*, 2011).

1.6. Efecto de los flavonoides sobre la expresión de *fliC*

Los resultados anteriores sugieren que los flavonoides podrían ejercer su efecto inhibitor sobre la producción de flagelina, la principal proteína del filamento flagelar. Para clarificar este punto, se analizó la expresión de *fliC*, cuantificando la actividad β -galactosidasa de la fusión transcripcional $P_{fliC}::lacZ$ en las cepas silvestre, DC3000A y DC3000R a lo largo de la curva de crecimiento, tanto en ausencia como en presencia de fletina, el flavonoide que provocó la mayor disminución de la motilidad (Figura 44).

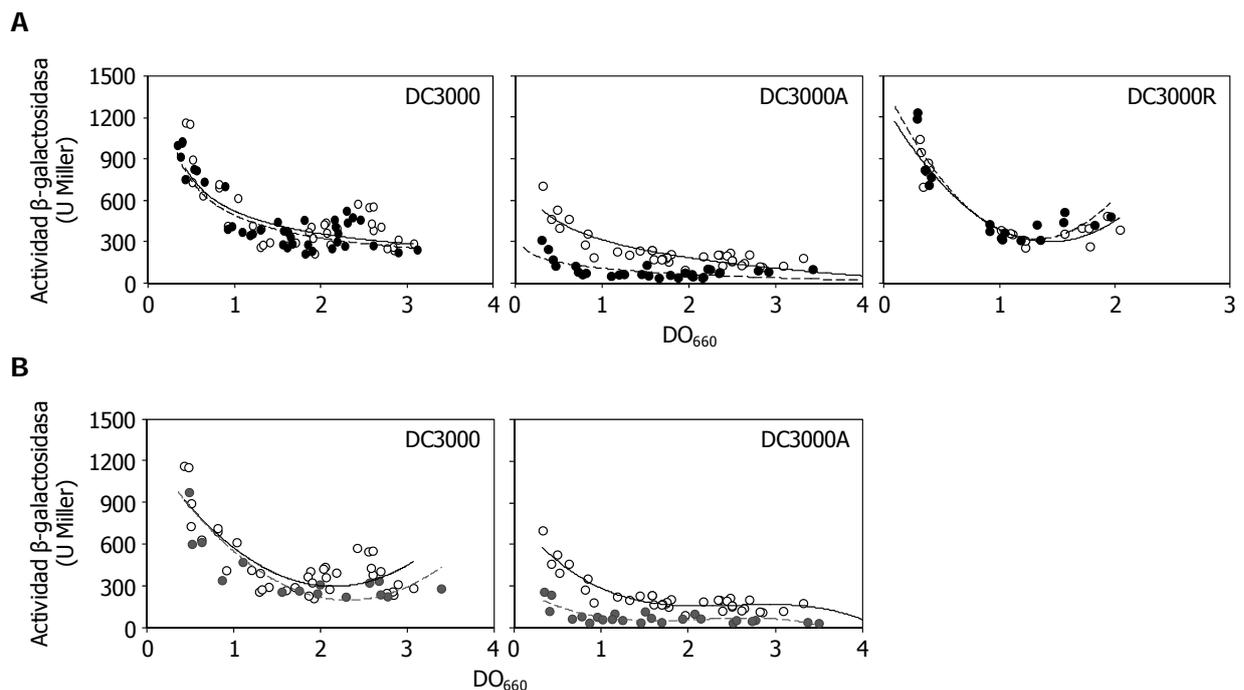


Figura 44. Expresión de *fliC* en diferentes flavonoides y cepas de Pto.

A. Actividad del promotor de *fliC* en presencia de fletina. La actividad β -galactosidasa se determinó en cultivos de las cepas DC3000, DC3000A y DC3000R en LB a 28°C en ausencia (\circ) o en presencia (\bullet) de fletina 0,3 mM (0,05 mM para DC3000A).

B. Actividad del promotor de *fliC* en presencia de naringenina. La actividad β -galactosidasa se determinó en cultivos de las cepas DC3000, DC3000A y DC3000R en LB a 28°C en ausencia (\circ) o en presencia (\bullet) de naringenina 0,3 mM (0,05 mM para DC3000A).

Los resultados mostrados corresponden a, al menos, 4 experimentos independientes.

La expresión del promotor de *fliC* en la cepa silvestre y en el mutante DC3000R fue similar en ausencia y en presencia de floretina, con niveles inicialmente elevados que fueron disminuyendo con el crecimiento. Por tanto, esa cantidad de floretina no parece afectar a la expresión de *fliC* en ambas cepas. Sin embargo, en el mutante DC3000A, la actividad del promotor *fliC* resultó claramente reprimida por floretina (Figura 43A). Este ensayo se llevó a cabo también con naringenina, otro flavonoide que también tiene un claro efecto sobre la motilidad de Pto, obteniéndose los mismos resultados (Figura 44B).

Para confirmar el efecto de los flavonoides en la transcripción de *fliC*, se midieron los niveles de su ARNm mediante qRT-PCR (Figura 45A). Al igual que en las curvas de actividad β -galactosidasa, la cantidad de ARNm de *fliC* en DC3000 y DC3000R no cambió en presencia de floretina con respecto a la condición control. Sin embargo, en el mutante DC3000A, la floretina provocó una disminución en el ARNm de *fliC*, aun estando presente a una concentración mucho más baja (0,05 mM) que en la cepa silvestre (0,3 mM). Curiosamente, incluso los niveles de *fliC* basales en este mutante fueron menores que en el silvestre. Como control negativo se utilizó una cepa de DC3000 carente del gen *fleQ*, que no presenta motilidad tipo *swimming* (H. Prada, no publicado), y en la cual no se detectó expresión de *fliC* (Figura 45A). Estos resultados concuerdan con otros obtenidos previamente en *P. aeruginosa* (Dasgupta *et al.*, 2003) y confirman que FleQ es un regulador importante en la expresión del sistema flagelar en Pto DC3000.

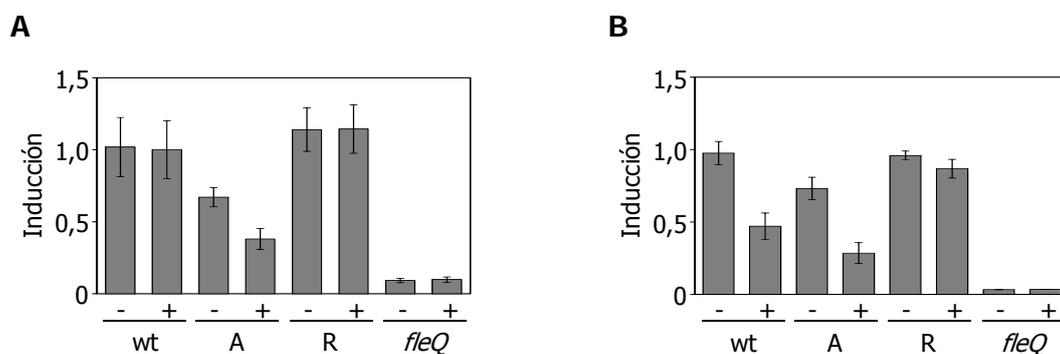


Figura 45. Cuantificación del ARNm de *fliC* mediante RT-PCR cuantitativa.

A. Expresión relativa de *fliC* en LB. Las cepas DC3000, DC3000A, DC3000R y *fleQ* se cultivaron en LB a 28°C en ausencia y en presencia de floretina (0,3 mM o 0,05 mM para DC3000A) hasta una DO_{660} de 1,5. A partir de 1 μ g de ARN total se sintetizó el ADNc para la qRT-PCR, utilizándose la expresión de *gyrA* como normalizador y la cepa silvestre sin floretina como referencia.

B. Transcripción de *fliC* en MMF. Las cepas se cultivaron en LB hasta alcanzar una DO_{660} de 0,5, se recogieron, lavaron y resuspendieron en MMF, tanto en ausencia como en presencia de floretina (0,15 mM), incubándose durante 3 horas a 25°C, tras lo cual se recogieron las células y se aisló el ARN total para la síntesis de ADNc. Se utilizó la expresión de *gyrA* como normalizador y la cepa silvestre sin floretina como referencia.

Los resultados mostrados corresponden a los promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes con tres réplicas técnicas.

Todos los experimentos anteriores se realizaron con cultivos crecidos en LB. Para averiguar si los flavonoides podían ejercer el mismo efecto sobre bacterias virulentas, utilizamos el medio mínimo MMF, que imita el apoplasto de la planta e induce la expresión del sistema de secreción tipo III (T3SS) en Pto DC3000 (Huynh *et al.*, 1989; Rahme *et al.*, 1992). Así, se evaluaron los niveles de ARNm de *fliC* mediante qRT-PCR en cultivos de Pto DC3000, DC3000A, DC3000R y *fleQ* en ausencia y presencia de floretina, tomando las muestras para el aislamiento del ARN como se describe en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. En Pto DC3000, se detectó un 50% menos de ARNm de *fliC* cuando el medio se suplementó con floretina, en comparación con el MMF no suplementado (Figura 45B). En DC3000R, los niveles de ARNm en ausencia de floretina fueron similares a los de la cepa silvestre y solo disminuyeron un 10% en presencia de ésta. Sin embargo, los niveles basales de ARNm de *fliC* en DC3000A fueron un 25% menores que en el silvestre y disminuyeron aún más en presencia de floretina (Figura 45B). Por tanto, los resultados de las qRT-PCR corroboran las observaciones previas que mostraban que la presencia de floretina provocaba una disminución de la motilidad tipo *swimming* en ambas cepas (Figuras 37 y 38). Además, el hecho de que la expresión basal de *fliC* sea más baja en DC3000A explica por qué nadaba más lento que la cepa silvestre (Figura 35 y 37).

1.7. Efecto de los flavonoides sobre los niveles de flagelina

Los resultados anteriores muestran que la floretina provoca una disminución de la expresión de *fliC* que es evidente, tanto en LB como en MMF, en el mutante DC3000A, y solo en MMF en la cepa silvestre. Para determinar si la floretina afectaba a la producción de flagelina, se realizaron extractos de proteína total de las cepas silvestre y mutantes crecidas en LB y MMF, tanto en presencia como en ausencia de floretina, y se llevó a cabo la inmunodetección de FliC utilizando un anticuerpo anti-FliC de *P. fluorescens* (De Weger *et al.*, 1987). Se debe mencionar que las proteínas FliC de *P. fluorescens* y de Pto DC3000 son 85% idénticas. Como control negativo se utilizaron cultivos de la cepa mutante *fliC*, que no produce la proteína.

La flagelina de Pto DC3000 tiene un tamaño de 29 KDa de acuerdo con su secuencia de aminoácidos; sin embargo, al utilizar el anticuerpo anti-FliC, la flagelina apareció en las membranas como una única banda de aproximadamente 33,5 KDa, probablemente debido a su glicosilación (Figura 46, Takeuchi *et al.*, 2003; Taguchi *et al.*, 2006). En algunas membranas también se observó una banda de aproximadamente 29 KDa, que corresponde a la flagelina no glicosilada, ya que se utilizaron extractos celulares totales, que poseen los dos tipos de flagelina.

Se estudiaron células cultivadas en los medios líquidos LB y MMF y el comportamiento fue similar en ambos casos: la producción de flagelina en la cepa silvestre fue máxima en ausencia de floretina y

disminuyó ligeramente en su presencia (Figura 46). El mutante DC3000A produjo menos FliC que el silvestre en ausencia de floretina y disminuyó aún más en su presencia. En el mutante DC3000R, la cantidad de flagelina fue similar a la de Pto DC3000 y no varió con floretina (Figura 46). En resumen, existe una buena correlación entre los recuentos de flagelos a nivel microscópico, la expresión y la producción de flagelina en las diferentes cepas y condiciones (Figuras 43 a 46).

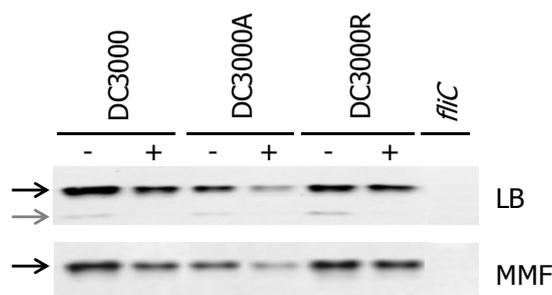


Figura 46. Producción de flagelina en Pto DC3000 y sus mutantes.

La producción de flagelina (FliC) se detectó en la cepa silvestre (DC3000) y en los mutantes DC3000A, DC3000R y *fliC*, cultivados en LB (panel superior) y MMF (panel inferior), tanto en ausencia (-) como en presencia (+) de floretina (0,3 mM para DC3000, DC3000R y *fliC*; 0,05 mM para DC3000A y 0,15 mM en medio MMF para todas las cepas). Los extractos de proteína total se obtuvieron como se describe en la sección 7.1 de Materiales y Métodos, se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana y se incubaron con un anticuerpo anti-flagelina. La banda de aproximadamente 33,5 kDa (flechas negras) corresponde a FliC glicosilada, la banda de aproximadamente 29 kDa (flecha gris) corresponde a FliC sin glicosilar.

1.8. Efecto de los flavonoides sobre la expresión de genes flagelares

Como se ha mencionado en la introducción, la síntesis de los componentes del flagelo y su ensamblaje están sometidos a un estricto control y la expresión de los genes flagelares esta regulada temporal y secuencialmente (Smith y Hoover, 2009). En *P. aeruginosa* y otras *Pseudomonas*, FleQ es el regulador maestro de la biogénesis flagelar y activa la transcripción de los genes de clase II, que codifican los componentes del cuerpo basal, del motor y del sistema de secreción, así como las proteínas reguladoras FleN y FleS/FleR. El sistema de dos componentes FleSR activa la expresión de los genes de clase III, que codifican el resto de los componentes del cuerpo basal, del gancho y de las proteínas asociadas al gancho. Esto permite la secreción del factor anti-sigma FlgM y la consecuente transcripción de los genes dependientes de σ^{28} o FliA (genes de clase IV), que codifican la flagelina (FliC) y algunas proteínas de quimiotaxis (Dasgupta *et al.*, 2003).

Hemos demostrado que la floretina inhibe la expresión de *fliC*. Con el fin de determinar a qué nivel de la cascada reguladora estaba actuando este flavonoide, se analizó mediante qRT-PCR la expresión

de genes representativos de la misma en las cepas silvestre y DC3000A cultivadas en ausencia y en presencia de floretina.

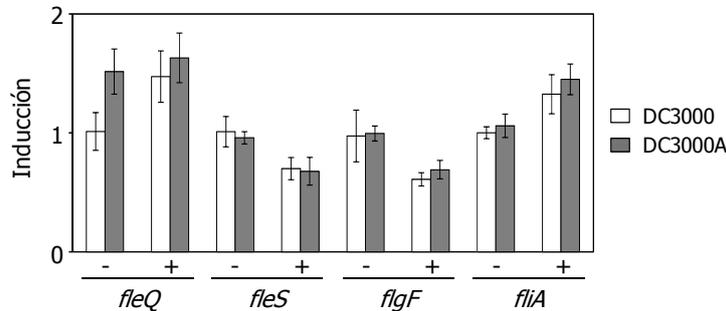


Figura 47. Expresión relativa de distintos genes flagelares en Pto DC3000.

Las cepas DC3000 y DC3000A se cultivaron hasta una DO_{660} de 1,5 en LB en ausencia (-) y presencia (+) de floretina (0,3 mM para la cepa silvestre y 0,05 mM para el mutante DC3000A). Se analizaron los niveles de expresión relativa de los genes indicados mediante qRT-PCR utilizando la expresión del gen *gyrA* como normalizador y la cepa silvestre sin floretina como referencia. Los resultados mostrados corresponden a los promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes con tres réplicas.

En el medio de laboratorio LB, los niveles basales de ARN de *fleQ*, *fleS*, *flgF* y *fliA* fueron similares en el silvestre y en el mutante DC3000A (Figura 47). La presencia de floretina provocó un ligero aumento en la expresión de *fleQ* con respecto a la condición control (sin flavonoide) en las dos cepas y causó una reducción sutil de los niveles de ARNm de *fleS* (que codifica la histidina quinasa sensora del sistema de dos componentes FleS/FleR) y *flgF* (que codifica otra de las proteínas del eje del cuerpo basal del flagelo), que, sin embargo, no afectaron a la expresión *fliC*, al menos en la cepa silvestre (Figura 44A y 45A). En el mutante DC3000A, los niveles de ARNm de *fliC* fueron menores que en el silvestre, incluso en ausencia de floretina y más en su presencia (Figura 44A y 45A). Por lo tanto, la inhibición de la expresión de flagelina por floretina no parece tener lugar a través de FleQ o FleS/FleR, al menos a nivel transcripcional, sino específicamente a nivel de *fliC*.

Estos resultados se corroboraron cuantificando la expresión de los promotores de *fleQ* y *flgF*. Para ello se construyeron las fusiones transcripcionales $P_{fleQ}::lacZ$ y $P_{flgF}::lacZ$ y se midió actividad β -galactosidasa a lo largo de la curva de crecimiento en Pto DC3000 y DC3000A, tanto en ausencia como en presencia de floretina (Figura 48). Se observa que la expresión de estos promotores no varió significativamente en presencia del flavonoide en ninguna de las dos cepas.

Respecto a los niveles de *fliA*, se observó un incremento de 1,5 veces en presencia de floretina con respecto a la condición control. FliA (σ^{28}) es el factor sigma necesario para la transcripción de los últimos genes de la cascada flagelar (genes de clase IV), incluido *fliC*. Si la expresión de *fliA* aumenta y esto se reflejara en los niveles de proteína, se esperaría una mayor transcripción de *fliC*; sin embargo,

se observa una disminución en su expresión en el mutante DC3000A en presencia de floreтина (Figura 44A y 45A). Por tanto, la inhibición de la expresión de flagelina por floreтина tampoco parece tener lugar a través de FliA, al menos a nivel transcripcional.

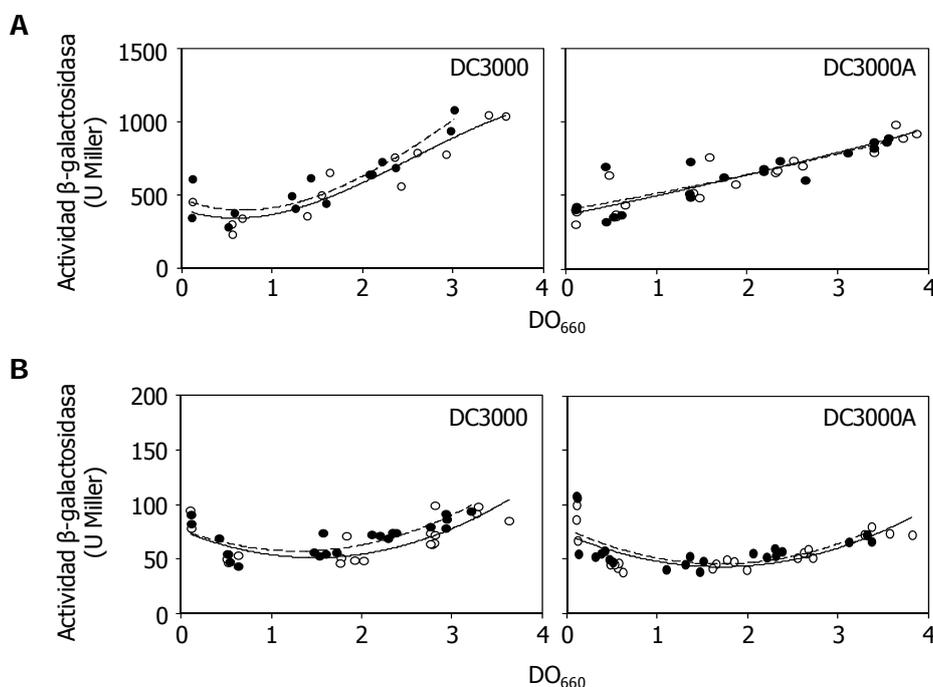


Figura 48. Expresión de los promotores de *fleQ* y de *flgF* en Pto DC3000 y DC3000A.

La actividad β -galactosidasa se determinó a lo largo de la curva de crecimiento a 28°C en LB de las cepas indicadas en ausencia (\circ) o en presencia (\bullet) de floreтина 0,3 mM (0,05 mM para DC3000A). Los resultados mostrados corresponden a, al menos, 3 experimentos independientes.

A. Actividad del promotor de *fleQ*.

B. Actividad del promotor de *flgF*.

En DC3000 la expresión de *fleQ*, *fleS*, *flgF*, *fliA* y *rpoN*, (Figura 49 y 56B) no cambió sustancialmente en MMF con floreтина, aunque la transcripción de *fliC* y los niveles de FliC sí se redujeron significativamente en su presencia (Figuras 45B y 46). En DC3000A, los genes expresados diferencialmente en MMF fueron *fliC* y *fliA* (Figuras 45B y 49B). Los niveles de ARNm de *fliA* fueron similares a los de DC3000 en ausencia de floreтина y disminuyeron un 20% en presencia del flavonoide (Figura 49B).

En el mutante *fleQ*, los niveles de *fliA* se redujeron un 50% en ausencia de floreтина, lo que significa que FleQ actúa directa o indirectamente en la transcripción de *fliA*, a diferencia de *P. aeruginosa*, donde *fliA* es un gen de clase I (Dasgupta *et al.*, 2003). Y aunque se observó un incremento de los niveles de ARNm de *fliA* en presencia de floreтина, en ningún caso eso implicó el aumento de la transcripción de *fliC* en este mutante.

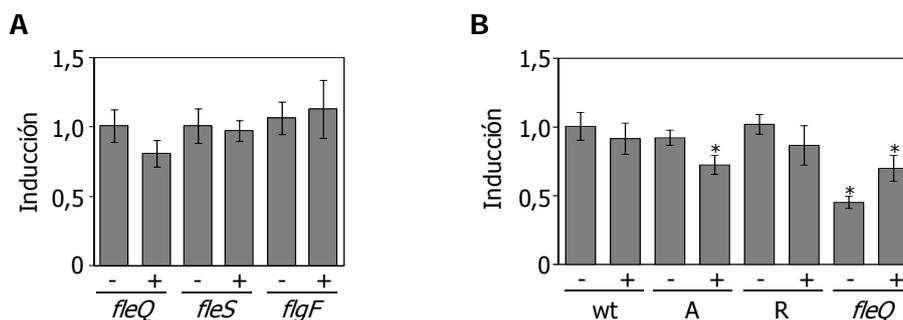


Figura 49. Expresión de distintos genes flagelares en MMF.

Las cepas se cultivaron en LB hasta alcanzar una DO_{660} de 0,5, se lavaron y se incubaron en MMF, tanto en ausencia como en presencia de floretina (0,15 mM) durante 3 horas a 25°C. Los valores de expresión de los genes indicados se cuantificaron mediante qRT-PCR y están referidos a la cepa silvestre sin floretina utilizando el gen *gyrA* como normalizador. Los resultados mostrados corresponden a los promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes con tres réplicas

A. Expresión relativa de los genes *fleQ*, *fleS* y *flgF* en Pto DC3000.

B. Expresión relativa de *fliA* en las cepas Pto DC3000 (wt), DC3000A (A), DC3000R (R) y *fleQ*. *, Indica diferencias significativas respecto a la cepa silvestre sin floretina, determinadas mediante análisis de varianza ($P < 0,05$).

1.9. Efecto de los flavonoides sobre los niveles de FliA

Dado que la inhibición de la expresión de la flagelina por floretina parece tener lugar específicamente en *fliC*, nos planteamos la posibilidad de que fuera debido a una reducción en la cantidad de FliA intracelular. Para comprobar esto, se obtuvieron extractos celulares totales de células cultivadas en LB y en MMF, tanto en presencia como en ausencia de floretina, y se analizó la abundancia de FliA mediante *Western Blot*, utilizando un antisuero anti-FliA de *P. aeruginosa* (Jyot *et al.*, 2007), dado que la proteína FliA de *P. aeruginosa* y la de Pto DC3000 son 84% idénticas.

En las membranas se observó una banda de aproximadamente 29 KDa que corresponde al factor sigma alternativo σ^{28} o FliA (Figura 50). Al comparar los niveles de FliA de las células cultivadas en LB y MMF en ausencia y presencia de floretina, no se observaron cambios en la cepa silvestre y el mutante DC3000R. Sin embargo, en la cepa mutante DC3000A se observó una disminución significativa de los niveles de proteína en presencia del flavonoide, que es más evidente en MMF (Figura 50).

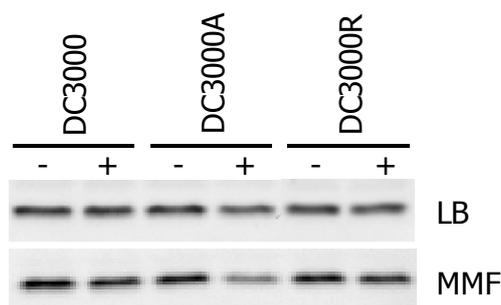
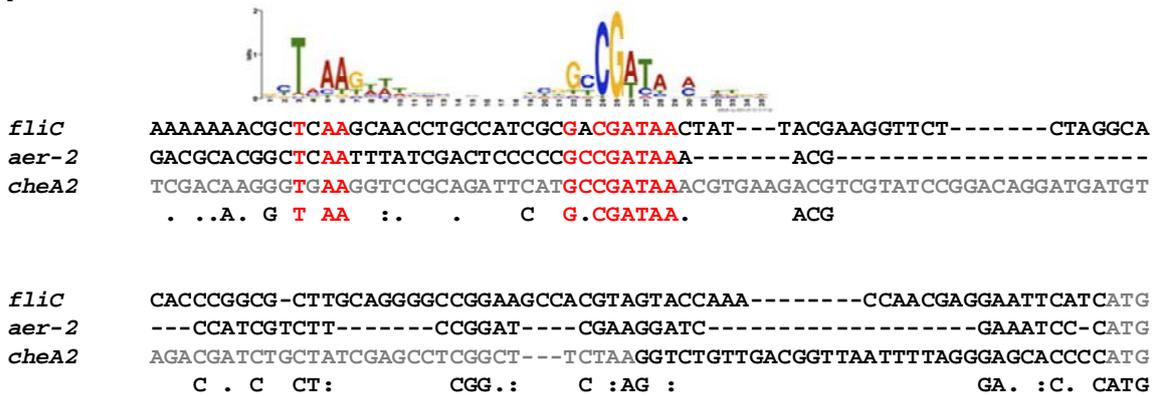


Figura 50. Efecto de la furofuran sobre la abundancia de FliA.

Niveles de FliA en cultivos de Pto DC3000, DC3000A y DC3000R en LB (panel superior) y MMF (panel inferior). Las cepas se cultivaron como se describe en el apartado 7.1 de Materiales y Métodos, en LB la furofuran se utilizó a 0,3 mM (0,05 mM para DC3000A) y a 0,15 mM en MMF. Las proteínas totales se recuperaron y separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron con un anticuerpo anti-FliA. La banda de aproximadamente 29 kDa corresponde a FliA.

En resumen, la furofuran causó una reducción significativa de los niveles de proteína del factor σ^{28} FliA en DC3000A, mientras que el cambio en la cepa silvestre fue más sutil. Por lo tanto, la acumulación de flavonoides como furofuran en la cepa carente del transportador MexAB-OprM reduce la expresión de la flagelina y la producción de flagelos como consecuencia de la disminución de los niveles intracelulares de FliA y/o de su actividad. Esto provocaría un descenso de la expresión de los genes dependientes de este factor sigma, por lo que, a continuación, se evaluó la expresión de *aer-2* y *cheA2*. En *P. putida* y *P. aeruginosa* ambos dependen de FliA (Dasgupta *et al.*, 2003; Österberg *et al.*, 2010; Rodríguez-Herva *et al.*, 2010) y en Pto DC3000 Filiatrault *et al.* (2011) determinaron la secuencia consenso reconocida por FliA en la región promotora de *fliC* y *aer-2*. Nosotros hemos observado que también está en *cheA2* (Figura 51A). De acuerdo con nuestra hipótesis, se observó que *aer-2* y *cheA2* mostraron el mismo comportamiento que *fliC*, es decir, sus niveles de ARNm disminuyeron significativamente en presencia de furofuran en la cepa DC3000A (Figura 51B). Sin embargo, esta disminución en los niveles de FliA no explica totalmente la drástica reducción de los niveles de proteína FliC observada en presencia de furofuran (Figura 46).

A



B

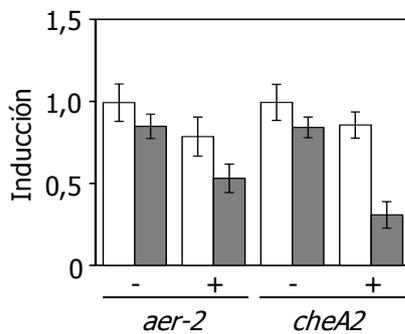


Figura 51. Análisis de la transcripción de otros genes dependientes de FliA en Pto DC3000.

A. Identificación y ubicación de las secuencias consenso de promotores dependientes de FliA (en rojo) en las regiones 5' de *fliC* (PSPTO_1949) y *aer-2* (PSPTO_2014) previamente identificadas por Filiatrault *et al.* (2011), y la determinada en *cheA2* (PSPTO_1982). La secuencia en gris indica región codificante del gen previo; en negro, la región intergénica, :, sustituciones conservadas; ., sustituciones semiconservadas

B. Niveles de ARNm de *aer-2* y *cheA2* en MMF. Las cepas DC3000 (blanco) y DC3000A (gris) se cultivaron en LB hasta alcanzar una DO₆₆₀ de 0,5 y posteriormente se incubaron en MMF durante 3 horas a 25°C en ausencia (-) y en presencia (+) de floretina (0,15 mM). A partir del ARN total extraído se sintetizó el ADNc para la qRT-PCR. Los valores de expresión de *aer-2* y *cheA2* se normalizaron con la expresión de *gyrA* y se refirieron a la cepa silvestre sin floretina. Los valores mostrados corresponden a los promedios y desviaciones estándar de, al menos, tres experimentos independientes con tres réplicas.

1.10. Efecto de los flavonoides sobre la cascada reguladora de los flagelos

En bacterias, los sistemas de dos componentes han sido ampliamente estudiados debido a su capacidad de percibir y reconocer señales ambientales, lo que permite a la bacteria responder y ajustarse rápidamente a las condiciones cambiantes del entorno. Como se ha mencionado en la introducción, el sistema de dos componentes GacS/GacA de *P. syringae* controla importantes procesos bacterianos (Tabla 1).

Estudios previos realizados en Pto DC3000 demostraron que los niveles de ARN de *fliO*, que codifica para una proteína estructural del sistema de secreción flagelar, eran inferiores en un mutante *gacA* que en la cepa silvestre. Además, este mutante no presentaba movimiento tipo *swarming*

(Chatterjee *et al.*, 2003). Debido a que el sistema GacS/GacA parece regular la motilidad en Pto DC3000, nos planteamos estudiar el comportamiento de un mutante deficiente en este sistema en presencia de flavonoides.

En primer lugar se corroboró que el mutante *gacA* no presentaba movimiento *swarming* (Figura 52A), como se había demostrado previamente (Chatterjee *et al.*, 2003). Aún así, se tomaron muestras de las células de *gacA* que permanecían inmóviles en el centro de las placas de *swarming*, tanto en ausencia como en presencia de floretina, y se observaron al microscopio óptico tras teñirlas por el método de Leifson. A pesar de no moverse, las células del mutante *gacA* presentan flagelos, aunque son menos abundantes y mucho más cortos que los de la cepa silvestre, tanto en ausencia como en presencia de floretina (Figura 52B).

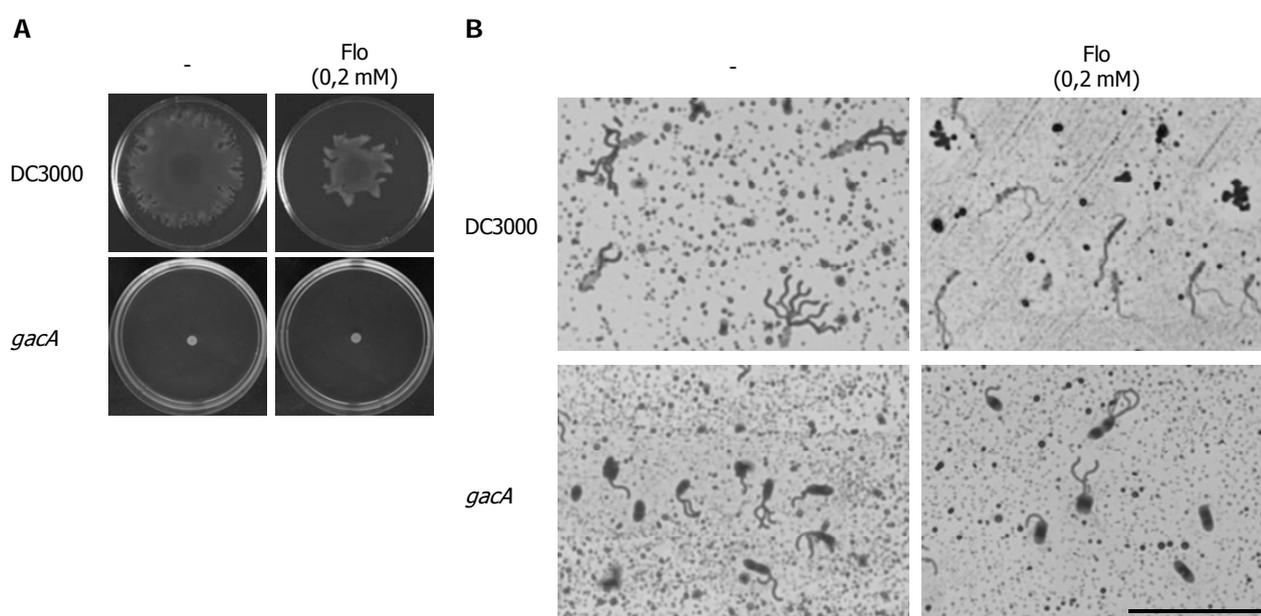


Figura 52. Ensayos de *swarming* con el mutante *gacA*.

A. 4×10^6 células de las cepas Pto DC3000 y *gacA* se inocularon en el centro de placas de PG-agar (0,5% agar) sin (-) y con floretina (0,2 mM) y se incubaron a 25°C durante 24 horas. Las fotografías mostradas son representativas de dos experimentos diferentes.

B. Visualización de la abundancia de flagelos. Células de la cepa silvestre y del mutante *gacA* obtenidas de las placas mostradas anteriormente (A) y teñidas por el método de Leifson. La barra representa 5 μ m.

A continuación se realizaron ensayos de *swimming* en ausencia y presencia de floretina. A pesar de no presentar motilidad tipo *swarming*, el mutante *gacA* es capaz de nadar en placas de LB semisólido, aunque su desplazamiento es menor que el de la cepa silvestre y no varía en presencia de floretina (Figura 53).

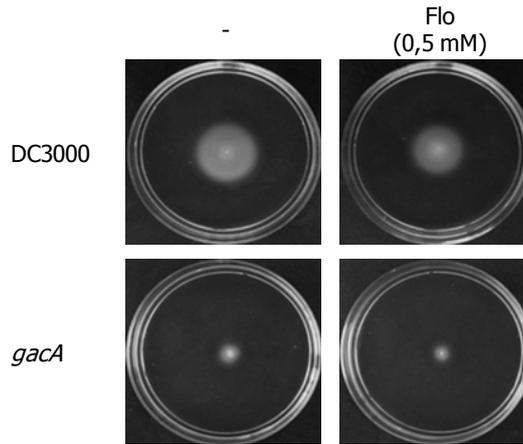


Figura 53. Ensayos de *swimming* con el mutante *gacA*.

4x10⁶ células de las cepas Pto DC3000 y *gacA* se inocularon en el centro de placas de LB semisólido (0,3% agar) sin (-) y con floretina (0,5 mM) y se incubaron a 25°C durante 48 horas. El ensayo se repitió tres veces obteniendo los mismos resultados.

La ausencia de efecto de la floretina en la cepa *gacA* en los ensayos de *swimming*, nos llevó a estudiar si el sistema de dos componentes GacS/GacA estaba implicado en la inhibición de *fliC* por flavonoides. Para ello, en primer lugar se midió la actividad del promotor *fliC* en el mutante *gacA* a lo largo de la curva de crecimiento en medio LB en ausencia y en presencia de floretina (Figura 54A).

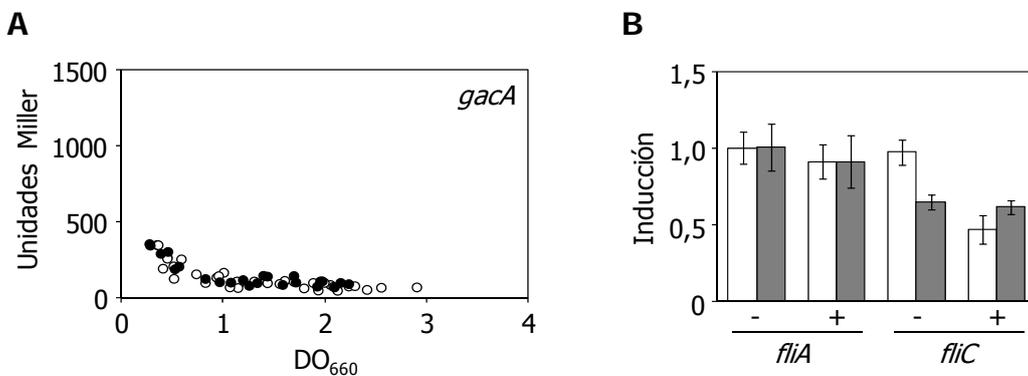


Figura 54. Efecto de la floretina sobre la expresión de *fliC* en el mutante *gacA*.

A. Expresión del promotor *fliC* en LB. La actividad β-galactosidasa se determinó a lo largo de la curva de crecimiento en cultivos del mutante *gacA* a 28°C, tanto en ausencia (○) como en presencia (●) de floretina (0,3 mM).

B. Niveles de ARNm de *fliA* y *fliC* en MMF. El ARN total se extrajo de la cepa silvestre DC3000 (blanco) y el mutante *gacA* (gris) tras cultivarlos en LB hasta una DO₆₆₀ de 0,5 y posteriormente en MMF durante 3 horas a 25°C en ausencia (-) y en presencia (+) de floretina (0,15 mM). Los valores de expresión fueron normalizados con la expresión de *gyrA* y referidos a la cepa silvestre sin floretina. Los resultados mostrados corresponden a los promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes con tres réplicas.

En ausencia de *gacA* y a diferencia de lo que ocurría en la cepa silvestre (Figura 44A), la expresión de *fliC* es baja y apenas cambió en presencia de floretina o con el crecimiento. A continuación, se midieron los niveles de ARNm de *fliA* y *fliC* en el mutante *gacA* crecido en MMF, observándose que la expresión de *fliA* fue similar a la de la cepa silvestre, tanto en ausencia como en presencia de floretina (Figura 54B). Por su parte, los niveles de ARNm de *fliC* resultaron ser menores en el mutante *gacA*, disminuyeron un 40% en MMF, confirmando el efecto positivo del sistema de dos componentes GacS/GacA sobre *fliC*. Sin embargo, esos niveles no variaron con floretina, a diferencia de lo observado en la cepa DC3000 (Figura 45), sugiriendo que la floretina también inhibe la expresión de la flagelina a través del sistema GacS/GacA.

La regulación por GacS/GacA se lleva a cabo principalmente a nivel postranscripcional. Por eso, para investigar el efecto de la floretina en la producción de flagelina, se cultivaron la cepa silvestre y el mutante *gacA* en ausencia y presencia de floretina, se prepararon extractos celulares totales y se realizaron ensayos de inmunodetección. Los resultados indicaron que los niveles de flagelina fueron menores en el mutante *gacA* que en la cepa silvestre en ausencia de floretina y no cambiaron en su presencia (Figura 55). Por lo tanto, la expresión de *fliC*, la síntesis de flagelina y la producción de flagelos estaban disminuidas en el mutante *gacA*, tanto en ausencia como en presencia de floretina (Figuras 52 a 55). Para comprobar si esto era debido a una disminución en la cantidad del factor sigma FliA, se determinaron los niveles de esta proteína en la cepa *gacA* y se observó que no variaron de forma significativa con floretina (Figura 55). Por tanto, estos resultados sugieren que el efecto de los flavonoides sobre la expresión de flagelina tiene lugar a través del sistema de dos componentes GacS/GacA.

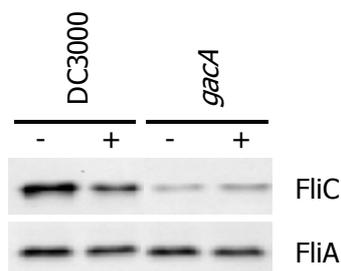


Figura 55. Niveles de FliC y FliA en las cepas silvestre y en el mutante *gacA*.

La producción de FliC y FliA en las cepas indicadas se determinó en MMF sin (-) y con (+) floretina (0,15 mM). Las proteínas de los extractos celulares se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y se detectaron con sus respectivos anticuerpos.

2. Efecto de los flavonoides sobre el sistema de secreción tipo III

La percepción de señales de la planta es importante para la activación de los genes del T3SS en bacterias fitopatógenas. En *P. syringae* los genes que codifican el T3SS se expresan en respuesta a determinadas condiciones ambientales, de modo que están reprimidos en medio rico, pero se activan cuando las bacterias se encuentran en el apoplasto vegetal o en un medio mínimo inductor definido (Huynh *et al.*, 1989; Rahme *et al.*, 1992; Rico y Preston, 2008; Xiao *et al.*, 1992). Esta regulación depende del factor sigma HrpL, de los reguladores transcripcionales HrpR/HrpS y también está controlada por los reguladores globales GacS/GacA (Chatterjee *et al.*, 2003; Grimm *et al.*, 1995; Hutcheson *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 1994; Xiao y Hutcheson, 1994; Zwiesler-Vollick *et al.*, 2002). Si hay moléculas de origen vegetal que actúan como inductoras, también es posible que algunas actúen como represoras, inhibiendo la expresión de los genes del T3SS en planta. Así, se ha demostrado que algunos compuestos fenólicos vegetales inhiben la expresión del T3SS en varias bacterias Gram-negativas (Li *et al.*, 2009; Vikram *et al.*, 2010, 2011). Para comprobar si esto también ocurría en Pto DC3000, se midieron los niveles de ARNm del factor sigma alternativo *hrpL* en ausencia y presencia de floretina en el medio mínimo inductor del T3SS, MMF. Se observó una inducción significativa de la expresión de *hrpL* en MMF en comparación con las células cultivadas en LB, como se había mostrado previamente (Huynh *et al.*, 1989). Sin embargo, en presencia de floretina, los niveles de ARNm de *hrpL* disminuyeron un 70% en la cepa silvestre y un 84% en el mutante DC3000A (Figura 56A). Como control negativo se utilizó una cepa mutante carente de *hrpS*, en la que la expresión de *hrpL* es mínima dada su estricta dependencia de HrpR/HrpS para su transcripción (Chatterjee *et al.*, 2003; Hutcheson *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 1994). Dado que se observó una fuerte inhibición de la expresión de *hrpL* en presencia del flavonoide, se planteó estudiar el modo de acción de la floretina en la vía de regulación del sistema de secreción tipo III.

En *P. syringae*, RpoN (σ^{54}) es el factor sigma alternativo requerido para la expresión de *hrpL* y HrpR/HrpS son proteínas de unión a ADN que activan la transcripción del promotor de *hrpL* (Chatterjee *et al.*, 2002, 2003; Hendrickson *et al.*, 2000a, 2000b). Para determinar si la floretina reprimía la expresión de *hrpL* a través de los reguladores HrpR/HrpS, se midieron los niveles de ARNm de *hrpR* y *rpoN* en la cepa silvestre y en el mutante *hrpS* mediante RT-PCR cuantitativa, observándose que no cambiaban significativamente en presencia de floretina en ninguna de las cepas (Figura 56B). Estos resultados sugieren que los flavonoides no inhiben la expresión de los genes del T3SS a través de la cascada reguladora HrpR/HrpS-HrpL, al menos a nivel transcripcional. Por tanto, la floretina podría inhibir la expresión génica del T3SS a través del sistema de dos componentes GacS/GacA. Para confirmarlo, se cuantificaron los niveles de ARNm de *hrpL* en un mutante carente de *gacA* y, en

comparación con la cepa silvestre, resultaron ser menores, como previamente habían observado Chatterjee *et al.* (2003). Sin embargo, la floretina no provocó una inhibición significativa de la expresión de *hrpL* en el mutante *gacA*, a diferencia de lo observado en la cepa silvestre o en el mutante DC3000A (Figura 56A).

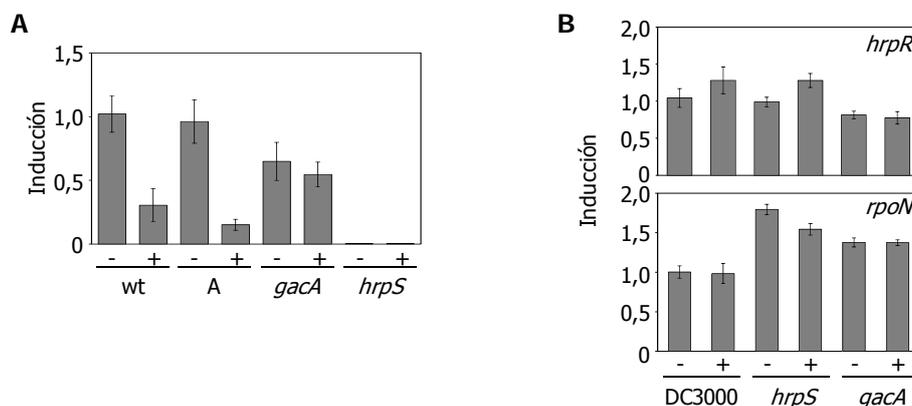


Figura 56. Expresión del sistema de secreción tipo III en condiciones de inducción.

Las cepas DC3000, DC3000A, *hrpS* y *gacA* se cultivaron en LB hasta una DO_{660} 0,5, se recogieron e incubaron a 25°C en MMF en ausencia (-) y presencia (+) de floretina (0,15 mM). Las muestras se recogieron a las 3 horas para extraer el ARN total y sintetizar el ADNc para la qRT-PCR. Los niveles de expresión se normalizaron con *gyrA* y se refirieron a la cepa silvestre sin floretina. Los resultados mostrados corresponden a los promedios y desviaciones estándar de al menos tres experimentos independientes con tres réplicas.

A. Expresión de *hrpL* en MMF medida por qRT-PCR.

B. Expresión de *hrpR* y *rpoN* en MMF medida por qRT-PCR.

Estudios previos habían demostrado que la expresión y el ensamblaje de un T3SS funcional en *P. syringae* causa auto-aglutinación de las células en un proceso dependiente de la presencia del pili Hrp (Ortiz-Martín *et al.*, 2010; Taira *et al.*, 1999). Para comprobar si los flavonoides ejercían algún efecto sobre la producción del T3SS de Pto DC3000, se analizó si cultivos de diferentes cepas de Pto aglutinaban en medio mínimo inductor MMF. Como control negativo del ensayo se utilizó una cepa mutante en el gen *hrpL* (I. Aragón y C. Ramos, no publicado), que es estrictamente necesario para la expresión del T3SS y que, por tanto, no expresa el pili Hrp.

Al llevar a cabo este ensayo y observar al microscopio de fluorescencia, se encontraron un gran número de grandes agregados bacterianos en las preparaciones de la cepa silvestre, que estaban ausentes en las preparaciones del mutante *hrpL* (Figura 57), confirmando que los agregados son consecuencia de la expresión de un T3SS funcional. En el mutante DC3000A el número y tamaño de los agregados fueron significativamente menores en comparación con la cepa silvestre, además de ser menos densos. Por otra parte, en presencia de floretina, los agregados de la cepa silvestre redujeron su tamaño y densidad y los de DC3000A desaparecieron (Figura 57). Asimismo, los ensayos de auto-

aglutinación mostraron que el mutante *gacA* produce un número de agregados similar a los de la cepa silvestre, pero son significativamente menos densos y prácticamente indistinguibles de los que se forman en presencia de floretina. Por lo tanto, la represión de la expresión del T3SS por floretina parece ocurrir principalmente a través del sistema de dos componentes GacS/GacA.

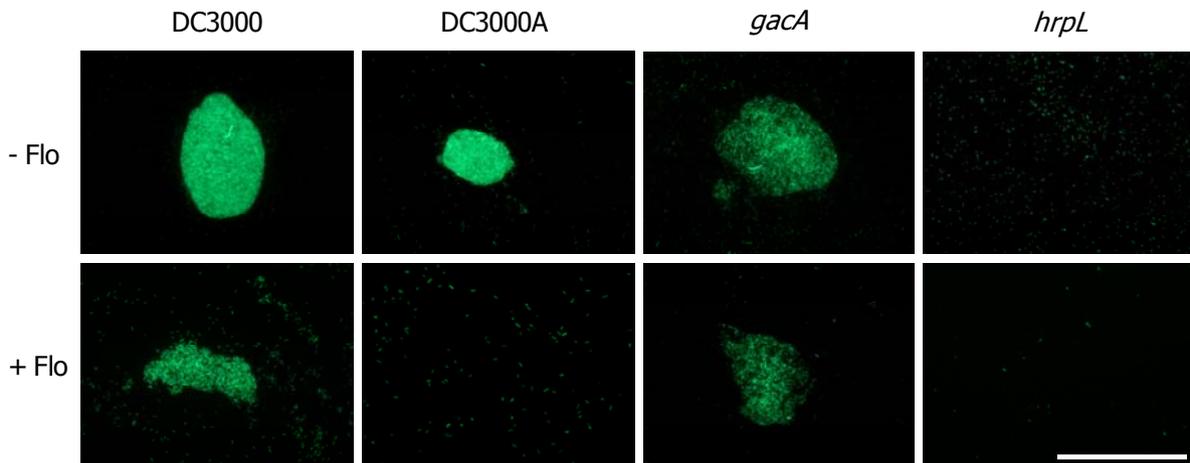


Figura 57. Ensayos de auto-aglutinación.

Microfotografías representativas de la aglutinación observada en diferentes cepas de Pto DC3000 expresando GFP tras 48 horas de incubación en medio mínimo inductor de *hrp* (MMF). Las muestras se tomaron como se describe en la Sección 4.7 de Materiales y métodos. La barra representa 100 µm.

3. Los flavonoides afectan a la expresión del flagelo y del T3SS a través de la ruta de regulación Gac-Rsm

En *P. syringae* el sistema de dos componentes GacS/GacA funciona como regulador maestro del metabolismo secundario controlando, entre otros, el *quorum sensing* y los factores sigma RpoS, RpoN y HrpL (Chatterjee *et al.*, 2003, 2007; Lapouge *et al.*, 2008). En *P. fluorescens*, una de las bacterias en las que esta ruta está mejor estudiada, la fosforilación de GacA por GacS, activa la transcripción de tres ARN reguladores de pequeño tamaño: *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ*, que, a su vez, son capaces de unir las proteínas represoras RsmA y RsmE (Sonnleitner y Haas, 2011; Valverde y Haas, 2008). Tras analizar el genoma de Pto y buscando los componentes de la vía de regulación Gac-Rsm, se concluyó que esta ruta podría ser similar a la de *P. fluorescens*, aunque con algunas diferencias: Pto posee múltiples homólogos de *rsmA* (hemos detectado 5 en el genoma de Pto, (Figura 58A) y siete genes que codifican ARNs de pequeño tamaño: *rsmX1-5*, *rsmY* y *rsmZ* (Figura 58B) (Kulkarni *et al.*, 2006; Moll *et al.*, 2010; Valverde *et al.*, 2003). En Pto DC3000 se ha demostrado que GacA controla la expresión de *rsmZ* y de otro ARN de pequeño tamaño denominado *rsmB* (Chatterjee *et al.*, 2003). Asimismo, el alineamiento de

la región aguas arriba de los genes *rsmX1-5* y *rsmY* de Pto DC3000 reveló que las seis secuencias tienen un motivo similar al sitio de unión de GacA, por lo que parecen estar regulados por esta proteína (Moll *et al.*, 2010; Valverde *et al.*, 2003).

A

```

PSPTO_3566 csrA-3      MLILTRKVGESINIGD-EITVTILGVQGLQ--VRLGINAPKNVSVHREEIY-KRIQAE LAPNQDPQ-----
PSPTO_1844 csrA-2      MLILTRRCAESLIIGDGEITVTVLGVKGNQ--VRIGVNAPKEVAHVHREEIY-LRIKKEKDEEPSH-----
PSPTO_1629 csrA-1      MLVLRDIDGETFSGID-DITVQILGVNGNQ--VRLGISAPKDIKVHRAEVY-KRIANKLSQAAQTQP-----
PSPTO_3943             MLCLTRRFGESIIIGN-DIKITVISGRDQ--IRLGDAPAGLAVDRSEIRTAKLANKPRNGSERHVG-----
PSPTO_5621 hypothetical_protein MLLLRRGENIVIGD-GIQIQVLSVEDTGDVRIQIEAPDVVEAQQGRTAGNEVTDHKPGPVITHKRRWRLVLTQ
** ** * .*: **: * : :. :*: :.* : ..
    
```

B

```

RsmX1 (PSPTO_5672) complement(3244255..3244374) 120 nt
ATCAACTGCAGCGCAGGAAGCGTTGCAGAGGTCACGGATGATCACCATTGCCGGGATGGCTACTGACAGGACGTCGGGATGGTATTGATAGAAAAACGACCCGCTTCGGCGGGTTTTTTT

RsmX2 (PSPTO_5671*) complement(4170253..4170369) 117 nt
AACAGCTGCAGCGAAGAACGCCGACGATCAGGACGATCGACCATGCGCAGGAGCTACTGACAGGACGTTGGAATGGTATGTTGCAATACCACCGCTTCGGCGGGTTTTTTT

RsmX3 (PSPTO_5673) 6144830..6144943 114 nt
AACAACTGGTGAACAAGGAGTTCACAGGATCAGGACGATCGACCATCGCCGGGAAGCGACGCGACAGGAGTTGGAATGGTCTTGGTACAAAACCGCTTCGGCGGGTTTTTTT

RsmX4 (PSPTO_5674) 6145122..6145235 114 nt
ATCAAGTGGTGAACAGGAGTTCACAGGATCAAGGATGATCGACCATCGCCTCGGAGCGCGCCGACAGGATGTCGGGATGGTCTTGGAAAAACCGCTTCGGCGGGTTTTTTT

RsmX5 (PSPTO_5675) complement(6198038..6198149) 112 nt
ATCAACTGGTGAACAAGGAGTTCACAGGATCAGGACCATGTCCTTGGAGGACGCGACAGGAGTTCGGGATGGTCTTGGAAAAACCGCTTCGGCGGGTTTTTTT

RsmY (PSPTO_5647) 555344..555465 122 nt
ATGGACGTAGCGCAGGAAGCGCAACAAGACATAACAGGACAGCTAGGGAAGCCTGCCAGGACGGCGGGGTGAAAGGGAAATCAGGAAAACAGTCTGGAAGCCCGCTTAGCGGGTTTTTTT

PrrB_RsmZ (PSPTO_5652) 1728435..1728566 132 nt
TGTGCCAACGCAAGGCAAGGCGATCAAGGATGACGGTCAGGACATCGCGGAAGCGATTATCAGGACGATGACAAGGGAATACAGGGATTAAGGACAAAATGTGGGGGGTTCATACCGCCCTTTTTTTT
    
```

Figura 58. Secuencia de las proteínas RsmA y de los ARNs de pequeño tamaño *rsm* de Pto DC3000.

A. Alineamiento de los cinco parálogos de RsmA encontrados en el genoma de Pto DC3000. *, residuos idénticos; :, sustituciones conservadas; ., sustituciones semiconservadas.

B. ARNs de pequeño tamaño *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ*. Se indica la secuencia, con su correspondiente número de acceso, coordenadas y longitud de los siete genes *rsm* descritos en Pto DC3000 implicados en la ruta de regulación Gac-Rsm. *, la secuencia de *rsmX2* propuesta por Moll *et al.* (2010), que es la mostrada en la figura, no es la misma que aparece en las bases de datos bajo el identificador PSPTO_5671.

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la floretina inhibe la expresión de la flagelina y del T3SS a través de la ruta de regulación Gac-Rsm. Para confirmarlo, se determinaron los niveles de ARN de *rsmY* y *rsmZ* en la cepa silvestre DC3000 y en los mutantes DC3000A y *gacA*, cultivadas en MMF y en ausencia y en presencia de floretina. No se pudieron medir los niveles de los ARNs *rsmX1-5* mediante RT-PCR cuantitativa debido a la dificultad para diseñar cebadores que permitieran discriminar entre ellos. Los resultados obtenidos por qRT-PCR (Figura 59) indican que la transcripción de *rsmY* y *rsmZ* dependen de GacA, aunque en diferente grado, porque la inactivación de *gacA* tuvo más efecto en *rsmY* que en *rsmZ*, que solo disminuyó levemente, como se había observado anteriormente (Chatterjee *et al.*, 2003). Además, los niveles de *rsmY* disminuyeron claramente en presencia de floretina, tanto en la cepa silvestre como en el mutante DC3000A, pero no en el mutante *gacA* (Figura 59A). Sin embargo, los niveles de *rsmZ* en la cepa silvestre y en el mutante *gacA* no cambiaron con floretina, pero sí disminuyeron en DC3000A (Figura 59B). Estos resultados indican que

la floretina afecta a la transcripción de *rsmY* a través de GacA, con lo que el efecto de este flavonoide en la expresión de la flagelina y del T3SS parece ocurrir, al menos en parte, a través de la cascada Gac-Rsm.

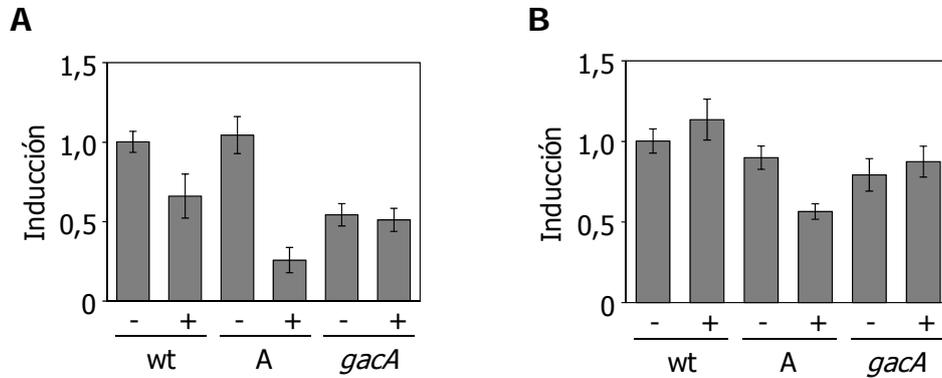


Figura 59. Niveles de *rsmY* y *rsmZ* en diferentes mutantes de Pto.

Las cepas DC3000, DC3000A y *gacA*, se cultivaron en LB hasta alcanzar una DO_{660} de 0,5, se recogieron, lavaron e incubaron en MMF en ausencia (-) y en presencia (+) de floretina (0,15 mM) durante 3 horas a 25°C. A partir de ARN total se sintetizó el ADNc para la qRT-PCR. Los valores de expresión de *rsmY* y *rsmZ* se normalizaron con *gyrA* y se refirieron a la cepa silvestre sin floretina. Los valores mostrados corresponden a los promedios y desviaciones estándar de, al menos, tres experimentos independientes con tres réplicas.

A. Niveles de *rsmY* en MMF.

B. Niveles de *rsmZ* en MMF.

DISCUSIÓN

El establecimiento de una población inicial del patógeno y la posterior colonización de los tejidos del hospedador son cruciales para el desarrollo de la enfermedad. Algunas bacterias fitopatógenas y, más concretamente *P. syringae*, son capaces de colonizar la filosfera gracias a su adaptación a este hábitat donde se enfrentan a condiciones de estrés, tanto abiótico como biótico. La síntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana es una de las respuestas de las plantas frente al ataque de patógenos (Dixon, 2001). Sin embargo, las bacterias han desarrollado mecanismos de resistencia a esos compuestos que, en algunos casos, resultan esenciales para el desarrollo de la enfermedad (Martínez *et al.*, 2009; Piddock, 2006). Los resultados del presente trabajo de tesis indican que *P. syringae* pv. tomato DC3000 posee mecanismos de defensa efectivos para resistir la acción de los flavonoides producidos por la planta durante la infección y, más aún, estos compuestos parecen mediar la interacción planta-patógeno.

1. Caracterización del sistema PmeR/MexAB-OprM de Pto DC3000

La supervivencia de los microorganismos en el ambiente está favorecida por su capacidad de producir compuestos tóxicos contra organismos competidores y por su habilidad para resistir los efectos de dichos compuestos (Thomashow y Weller, 1996). En este sentido, los sistemas MDR constituyen uno de los mecanismos más importantes de detoxificación celular, tanto en eucariotas como en procariotas (Paulsen, 2003). Al inicio de esta tesis se identificó un sistema transportador tipo RND en *P. syringae* pv. tomato DC3000: MexAB-OprM. Este sistema está conservado en otros patovares del complejo *P. syringae* y presenta un alto porcentaje de identidad con transportadores presentes en otras especies de *Pseudomonas* donde contribuye a la resistencia frente antibióticos, biocidas, disolventes orgánicos, etc.

Se ha propuesto que las bombas RND podrían desempeñar un papel activo en el metabolismo celular o simplemente eliminar subproductos no deseados. La expresión de estos transportadores debería estar entonces controlada por señales fisiológicas específicas relacionadas con la función del transportador en el metabolismo celular. Alternativamente, podrían estar implicadas en la resistencia a compuestos tóxicos producidos por los hospedadores o por otros microorganismos presentes normalmente en el medio ambiente de la bacteria (Piddock, 2006). Al mismo tiempo, el estudio de varios reguladores transcripcionales locales de esos sistemas ha demostrado que se unen directamente a una amplia gama de compuestos tóxicos similares a los exportados por las proteínas de membrana cuya expresión controlan, facilitando de ese modo la inducción de los genes de la bomba en respuesta a la presencia de diversas sustancias tóxicas (Chuanchuen *et al.*, 2002; Grkovic *et al.*, 1998;

Lomovskaya *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1996; Terán *et al.*, 2003, 2006). Sin embargo, la gran mayoría de los sustratos de la bomba y ligandos del regulador conocidos al inicio de este trabajo eran compuestos sintéticos, lo que indicaba la necesidad de identificar los sustratos y ligandos naturales de estas proteínas.

La inserción de un interposón en *mexA* interrumpe la expresión del operón *mexAB-oprM* (Figuras 13 y 14), por lo que la cepa DC3000A carece del transportador MexAB-OprM. La comparación de la susceptibilidad a diferentes compuestos antimicrobianos entre la cepa silvestre y el mutante DC3000A permitió identificar los sustratos de la bomba MexAB-OprM. La cepa carente de *pmeR*, DC3000R, permitió asimismo definir nuevos sustratos de la bomba tras observar que la resistencia a varios compuestos aumentaba en DC3000R por una mayor expresión del transportador (Tablas 12 y 14; Figura 14). Los resultados de (Stoitsova *et al.*, 2008) y de este trabajo indican que el transportador MexAB-OprM de Pto DC3000 posee un amplio rango de sustratos y confiere resistencia a múltiples antibióticos (β -lactámicos, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclina y cloranfenicol), biocidas (butilparabeno y metilparabeno) y metabolitos secundarios de plantas (berberina, (+)-catequina, morina, naringenina, floridzina y floretilina). Esta resistencia cruzada a compuestos de distinta naturaleza y estructura se había observado también en transportadores RND de otras bacterias, como TtgABC y MepABC de *P. putida* DOT-T1E y KT2442, respectivamente, que expulsan múltiples disolventes orgánicos y antibióticos (Fukumori *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 1998) o en el transportador AcrAB de los patógenos de plantas *D. dadantii* y *E. amylovora*, que confiere resistencia a antibióticos, colorantes y compuestos derivados de plantas, como floretilina y naringenina (Burse *et al.*, 2004a; Maggiorani-Valecillos *et al.*, 2006).

En este trabajo hemos analizado la expresión del operón de la bomba *mexAB-oprM* y el gen regulador *pmeR* a nivel transcripcional e investigado el papel de la proteína PmeR en este proceso. Algunos transportadores de tipo RND mantienen una expresión constante a lo largo de la curva de crecimiento, como el sistema SmeDEF de *Stenotrophomonas maltophilia*, mientras que otros, como *acrAB* de *E. coli* o *mexAB-oprM* de *P. aeruginosa*, varían con la fase de crecimiento (Evans y Poole, 1999; Ma *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2002a). Los genes del operón *mexAB-oprM* se expresan *in vivo* a un nivel basal relativamente alto y de manera constante a lo largo de la curva de crecimiento (Figura 19). Sin embargo, el patrón de expresión de *pmeR* fue diferente, observándose un aumento de su transcripción en la transición a fase estacionaria que no depende del factor sigma RpoS (Figura 20), responsable de la inducción de genes durante esa fase en *E. coli* y *P. aeruginosa* (Ishihama, 1999; Potvin *et al.*, 2008; Venturi, 2003). Además, la expresión de *pmeR* también está regulada por una secuencia repetida e invertida presente en la región líder de su ARNm que, probablemente, afecta a su

estabilidad y/o traducción. Sin embargo, con los resultados obtenidos hasta el momento, es difícil inferir el tipo de regulación al que está sujeta la expresión de *PmeR* (Figura 28).

En el caso del operón de la bomba *mexAB-oprM* de Pto DC3000, no se puede descartar la participación de otras proteínas reguladoras, incluyendo reguladores globales, ya que la adición de floretina aumentó levemente la expresión de *mexAB-oprM* en el mutante carente de *PmeR* (Figuras 18 y 19). La expresión de algunos transportadores RND está controlada por reguladores globales y por sistemas de dos componentes. Por ejemplo, la expresión del operón *acrAB* de *E. coli* está reprimida por *AcrR* (de la familia TetR) a nivel local y por varios reguladores globales de respuesta a estrés como *MarA*, *Rob*, *SoxS* (Ma *et al.*, 1995, 1996; Martin y Rosner, 1995, 2002) y por el regulador implicado en división celular y en *quorum sensing* *SdiA* (Rahmati *et al.*, 2002). La bomba *MtrCDE* de *Neisseria gonorrhoeae* está regulada por el represor local *MtrR* y por el regulador global *MtrA* (Shafer *et al.*, 2001). Por otra parte, la regulación por sistemas de dos componentes se ha demostrado en varios transportadores de tipo RND, como *mdtABC* y *yhiUV* de *E. coli* regulados por *BaeS/R* y *EvgS/A*, respectivamente; el transportador *smeABC* regulado por *SmeS/R* en *S. maltophilia*; y la bomba *mexAB-oprM* de *P. aeruginosa*, regulada por *RocS1* o *RocS2/RocA2* (Baranova y Nikaido, 2002; Li *et al.*, 2002; Nishino y Yamaguchi, 2002; Sivaneson *et al.*, 2011). En Pto DC3000 se han encontrado ortólogos de las proteínas de *P. aeruginosa* *RocS1* y *RocS2*: PSPTO_1482 (33,5-41% de identidad) y de *RocA2*: PSPTO_4151 (59% identidad). El bajo porcentaje de identidad sugiere que las señales ambientales que reconocen y/o las proteínas con las que interactúan son probablemente diferentes en esta cepa.

En cualquier caso, la transcripción de los genes de la bomba y del regulador incrementa en presencia de varios compuestos químicos estructuralmente distintos, como butil y metilparabeno o floretina y naringenina. La adición de estos compuestos, que también son sustratos del transportador *MexAB-OprM*, provoca la desrepresión de los promotores de *mexAB-oprM* y *pmeR in vivo* (Figura 17). Estas observaciones, junto con el hecho de que la expresión de *mexAB-oprM* y *pmeR* incrementó en el mutante DC3000R en comparación con la cepa silvestre, y el ligero pero reproducible aumento de la resistencia a varios compuestos antimicrobianos en la cepa DC3000R, demuestran que *PmeR* es el represor local de *mexAB-oprM* y que también regula su propia expresión (Figuras 17, 18 y 19; Tabla 14). Por tanto, la inducción del operón de la bomba *mexAB-oprM* y su gen regulador, *pmeR*, en respuesta a distintos compuestos antimicrobianos está controlada principalmente por la proteína represora *PmeR* (Figuras 17-19 y 26) y este mecanismo común de regulación es consecuencia del solapamiento de sus regiones promotoras con el operador de *PmeR* (Figura 25).

La purificación del regulador *PmeR* permitió llevar a cabo su caracterización funcional. Mediante ensayos *in vitro* de retardo en gel y de *footprint* de protección frente a DNasa I y DMS (Figuras 24 y 25),

se identificó el operador de PmeR en la región intergénica *pmeR-mexA* y se demostró que PmeR se disocia del mismo tras la unión a los compuestos que inducen su expresión *in vivo* (Figuras 17 y 25). PmeR es miembro de la familia de reguladores transcripcionales TetR, que poseen una región N-terminal muy conservada con un motivo hélice-giro-hélice (HTH, *helix-turn-helix*) de unión a ADN. En contraste, la región C-terminal es variable y comprende el dominio de dimerización y el de unión a efectores (Ramos *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2010). Proponemos que PmeR, al igual que los reguladores mejor caracterizados de la familia TetR, reprime la transcripción de *mexAB-oprM* y *pmeR* uniéndose al operador mediante el HTH de su dominio N-terminal y esta represión se revierte tras la unión de moléculas estructuralmente diferentes al sitio de unión a ligando en su dominio C-terminal, lo que provoca su disociación del ADN. Sin embargo, dentro de la familia TetR hay proteínas que se unen a operadores de 11 pb, como EF0787, y otros, como CgmR o QacR, que se unen a secuencias más largas, de 30 y 26 pb, respectivamente (revisado en Yu *et al.*, 2010). PmeR se une a un operador de 22 pb que solapa con los promotores de *mexAB-oprM* y *pmeR*, específicamente con la región -10 del promotor *pmeR* y su inicio de transcripción, y con la caja -35 del promotor *mexAB-oprM*. Este sitio operador comprende dos mitades de 11 pb y tiene una simetría compleja, con dos posibles secuencias pseudo-palindrómicas superpuestas (Figuras 25C y 60).

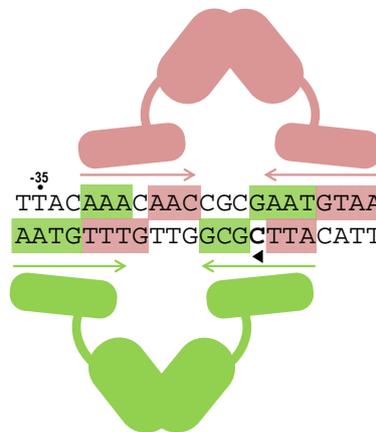


Figura 60. Representación del modo de unión de PmeR a su región operadora.

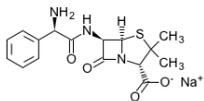
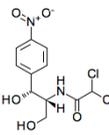
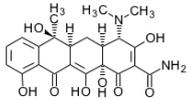
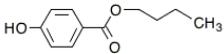
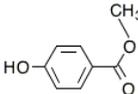
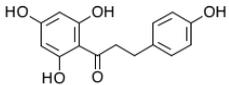
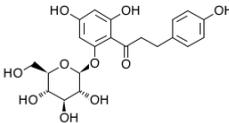
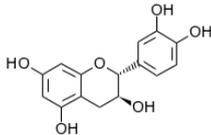
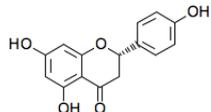
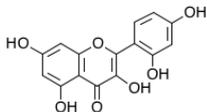
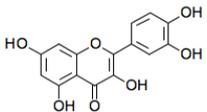
Modelo de unión de dos dímeros de PmeR a su ADN operador (en la región intergénica *pmeR-mexA*) similar al descrito para QacR (Schumacher y Brennan, 2002). Las flechas grises representan la secuencia de ADN reconocida por cada monómero. Se indica la posición -35 del promotor de *mexA*, el punto de inicio +1 (en negrita) y el sentido de la transcripción (punta de flecha) de *pmeR*.

Con los resultados obtenidos en este trabajo, proponemos un modelo de unión de PmeR a su operador similar al descrito para QacR (Schumacher y Brennan, 2002); es decir, la unión cooperativa de dos dímeros de PmeR a una región de 22 pb que contiene dos secuencias pseudo-palindrómicas.

En este modelo, cada mitad recibiría dos monómeros pertenecientes a dímeros diferentes (Figuras 25C y 60). Así, el represor PmeR bloquea el acceso de la ARN polimerasa a los promotores de *mexAB-oprM* y *pmeR*, de la misma manera que TetR inhibe la expresión de los promotores que regula (Orth *et al.*, 2000). Además, la ubicación del operador respecto a los promotores y a los inicios de la transcripción de *mexAB-oprM* y *pmeR* explica en parte por qué $P_{mexAB-oprM}$ se expresa a un nivel relativamente alto *in vivo*, mientras que el nivel basal de P_{pmeR} es menor, y cómo PmeR puede regular sus propios niveles de expresión en respuesta a los diferentes tipos y concentraciones de efectores (Figuras 17 y 26). La represión de *mexAB-oprM* y *pmeR* por PmeR puede eliminarse añadiendo butilparabeno, metilparabeno, morina, naringenina, quercetina o floretina, lo que resulta en la inducción de ambos promotores (Figuras 17 y 26; Tabla 16). Estos compuestos estructuralmente diferentes activan la expresión de la bomba al unirse, tanto a la proteína PmeR libre inhibiendo su unión al operador, como al complejo PmeR-ADN, con la consecuente liberación de PmeR de su operador, lo que permite el inicio de la transcripción.

El reconocimiento directo de compuestos con estructuras químicas muy diferentes es una característica común en la regulación de transportadores MDR mediada por reguladores de la familia TetR en bacterias (Yu *et al.*, 2010). La determinación de la estructura de varias proteínas de esta familia ha permitido establecer que esa capacidad para reconocer una amplia diversidad de compuestos reside en un bolsillo de gran volumen que se compone de pequeños bolsillos superpuestos, lo que genera múltiples sitios de unión a ligando (Alguel *et al.*, 2007; Brooks *et al.*, 2007; Madoori *et al.*, 2009; Murray *et al.*, 2004; Schumacher *et al.*, 2001, 2004). Nuestros resultados muestran que, tanto el transportador MexAB-OprM de Pto DC3000 como su represor local PmeR, reconocen múltiples compuestos que, pese a la variedad de estructuras, poseen la característica común de ser moléculas anfipáticas con un núcleo hidrofóbico formado por uno o más anillos aromáticos con diferentes grupos polares, que son los que probablemente condicionan la menor o mayor afinidad de unión a PmeR (Tabla 16). El fenómeno del reconocimiento de múltiples moléculas con estructuras químicas diferentes se ha descrito en proteínas reguladoras y transportadoras y, en ambos casos, la presencia de residuos aromáticos en el bolsillo es importante, ya que inmovilizan los anillos de los ligandos y permiten establecer interacciones electrostáticas con los residuos polares de estos (Murray *et al.*, 2004; Schumacher y Brennan, 2003; Zheleznova *et al.*, 2000).

Tabla 16. Estructura de los sustratos de la bomba MexAB-OprM, inductores de su expresión y efectores de PmeR ensayados en este trabajo

Tipo de compuesto	Nombre	Estructura	Sustrato	Inductor	Efeotor
Antibióticos	Ampicilina		+	-	-
	Cloranfenicol		+	-	-
	Tetraciclina		+	- *	-
Biocidas	Butilparabeno		+	+	++
	Metilparabeno		+	++	++
Flavonoides	Floretina (dihidrocalcona)		+	++	++
	Floridzina (dihidrocalcona)		+	-	-
	(+)-Catequina (flavanol)		+	-	+/-
	Naringenina (flavanona)		+	++	++
	Morina (flavonol)		+	ND	++
	Quercetina (flavonol)		-	ND	++

ND, no determinado; *, no mostrado; el número de + indica mejor inductor o efeotor; +/-, inhibe la formación del complejo PmeR/operador pero no causa su disociación.

PmeR funciona como un regulador que une múltiples compuestos antimicrobianos, algunos de los cuales son sustratos de la bomba MexAB-OprM, que modulan su propia expresión y la del transportador. En este sentido, es importante destacar que el perfil de efectores de PmeR es más

limitado que el rango de sustratos de MexAB-OprM, lo que significa que la expresión de la bomba se induce solo en presencia de algunos de los compuestos que puede expulsar. La amplia especificidad de sustrato de este transportador parece ser una adaptación evolutiva de las bacterias para sobrevivir en diferentes entornos. Sin embargo, la gran mayoría de sustratos y ligandos conocidos de la bomba y del regulador son compuestos sintéticos, por lo que posiblemente no se encuentren en el hábitat natural de las bacterias. Por tanto, es probable que esos compuestos sintéticos expulsados por la bomba (y/o reconocidos por el regulador) se asemejen a los sustratos/ligandos naturales. La presencia de transportadores con una amplia especificidad de sustrato en bacterias inocuas o patógenas con diferentes hospedadores y nichos ecológicos, como *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. syringae*, *A. tumefaciens*, *Erwinia* sp. o *Salmonella* sp., entre otras, parece indicar que tienen un papel fisiológico en la eliminación de moléculas producidas en su ambiente natural por lo que, probablemente, la expulsión de antibióticos y compuestos xenobióticos ocurre accidentalmente (Lewis, 2001; Poole, 2008). Actualmente, numerosos estudios avalan la función fisiológica de estos sistemas de transporte en bacterias y su importancia en colonización y patogenicidad. Así, se ha demostrado que eliminan agentes antimicrobianos presentes en el intestino del hospedador, como sales biliares, ácidos grasos o indol (Hirakawa *et al.*, 2005; Lacroix *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 1995; Nikaido *et al.*, 2008), también exportan hormonas esteroideas (Elkins y Mullis, 2006), determinantes de virulencia como adhesinas y toxinas (Buckley *et al.*, 2006; Kang y Gross, 2005; Kim *et al.*, 2004), moléculas señal involucradas en *quorum sensing* (Chan *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 1998; Rahmati *et al.*, 2002), compuestos tóxicos derivados del metabolismo (Van Dyk *et al.*, 2004) y metabolitos secundarios de plantas (Barabote *et al.*, 2003; Burse *et al.*, 2004a; González-Pasayo y Martínez-Romero, 2000; Maggiorani-Valecillos *et al.*, 2006; Palumbo *et al.*, 1998).

En esta tesis se han identificado compuestos vegetales que son efectores de la proteína reguladora PmeR y sustratos de la bomba de eflujo y se ha confirmado que el transportador MexAB-OprM de Pto DC3000 confiere resistencia a compuestos antimicrobianos de origen vegetal, principalmente flavonoides (Tablas 12 y 15, Figura 14). Otros autores han demostrado que *A. thaliana* y *S. lycopersicum* (tomate) responden a la infección por Pto DC3000 produciendo ácidos orgánicos, flavonoides como rutina (quercetina glicosilada), fenilpropanoides y otros compuestos fenólicos (Hagemaijer *et al.*, 2001; López-Gresa *et al.*, 2010, 2011). Por tanto, la bomba MexAB-OprM parece tener un papel fisiológico relevante en el hábitat natural de DC3000 como mecanismo de defensa frente a esos compuestos. Además, algunas moléculas señal de plantas, como la floretina y la naringenina, promueven significativamente la expresión de *mexAB-oprM*, lo que reduciría en gran medida el efecto de estos compuestos en los estadios iniciales de la interacción planta-bacteria. De hecho, la

interrupción de *mexAB-oprM* provoca una disminución de la capacidad de Pto para colonizar la planta hospedadora y competir eficientemente con la cepa silvestre (Figuras 29 y 32).

En resumen, la bomba MexAB-OprM de Pto DC3000 media la resistencia a compuestos antimicrobianos producidos por las plantas confiriéndole protección, facilitando la supervivencia inicial en su nicho ecológico (la superficie de las hojas), la posterior colonización de la planta hospedadora y el desarrollo de la enfermedad. Además, MexAB-OprM es capaz de eliminar otros agentes antimicrobianos, como por ejemplo antibióticos, lo que podría permitir a Pto DC3000 competir eficientemente con otras bacterias epifitas presentes en las hojas. En este sentido, hemos demostrado que existe una ruta común para la respuesta a compuestos antimicrobianos estructural y funcionalmente diferentes: antibióticos, biocidas y metabolitos secundarios de plantas, como los flavonoides.

2. Efecto de los flavonoides sobre factores de virulencia de Pto DC3000

Está ampliamente documentado que extractos de plantas, moléculas señal y diversos compuestos con actividad antimicrobiana pueden regular positiva o negativamente la virulencia en *P. syringae* y otros patógenos. Así, determinadas moléculas señal de plantas activan la expresión de genes implicados en la síntesis de toxinas (como siringomicina y coronatina), la degradación de la pared celular y el sistema Hrp de secreción tipo III (Li *et al.*, 1998; Mo y Gross, 1991; Xiao *et al.*, 1992). Por el contrario, varios macrólidos inhiben la motilidad en *Proteus mirabilis* y *P. aeruginosa*, donde concentraciones subinhibitorias de eritromicina, claritromicina, azitromicina, suprimen la expresión de flagelina (Kawamura-Sato *et al.*, 2000). También extractos de arándano causan la inhibición de la expresión de *fliC* y de la motilidad en *E. coli* UPEC (Hidalgo *et al.*, 2011) y flavonoides como naringenina, kaemferol, quercetina, apigenina y catequina suprimen la señalización célula-célula y, por consiguiente, la producción de factores de virulencia controlados por *quorum sensing* en *Vibrio harveyi*, *E. coli* y *P. aeruginosa* (Vandeputte *et al.*, 2010, 2011; Vikram *et al.*, 2010). Específicamente, la naringenina también inhibe la producción de T3SS en *V. harveyi* (Vikram *et al.*, 2010) y atenúa la virulencia y la motilidad de *Salmonella enterica* al inhibir la expresión del regulador maestro FlhDC y de los genes flagelares y del T3SS necesarios para la invasión de las células no fagocíticas en el intestino (Vikram *et al.*, 2011). También se ha demostrado que otros metabolitos vegetales reprimen los genes del T3SS en bacterias fitopatógenas. Así, el ácido *p*-cumárico, un compuesto fenólico de origen vegetal, reprime la expresión de T3SS en *D. dadantii* a través del sistema de dos componentes HrpX/Y, lo que sugiere un mecanismo específico de defensa de la planta contra este patógeno (Li *et al.*, 2009).

Igualmente, un extracto de bajo peso molecular de planta también inhibe la expresión de los genes *hrp* de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Watt *et al.*, 2009). Sin embargo, poco se sabe sobre cómo las bacterias perciben esas señales y las cascadas reguladoras implicadas en la respuesta.

Los resultados presentados en esta tesis contribuyen a esclarecer la forma en que Pto DC3000 detecta y responde a los flavonoides, ya que hemos demostrado que diferentes flavonoides (morina, naringenina y floretina), antibióticos (cloranfenicol), y biocidas (butil y metilparabeno), pero no floridzina (floretina-2'- β D-glucósido), disminuyen tanto la motilidad tipo *swimming* como *swarming* inhibiendo la síntesis de flagelos (Figuras 35-41 y 43). Se debe resaltar que los flavonoides no afectaron el crecimiento de las cepas porque se utilizaron a concentraciones muy por debajo de su MIC, tanto para DC3000 como para los diferentes mutantes (Figura 19); por tanto, las diferencias observadas en los fenotipos no se deben a los posibles efectos tóxicos de esos compuestos. Investigando a qué nivel de la compleja cascada reguladora de los genes flagelares estaban actuando los flavonoides, nos sorprendió descubrir que la pérdida de flagelos se debe a una disminución de la expresión de la proteína FliC (Figura 46), que se detecta ya a nivel transcripcional en MMF, pero no en LB (Figura 45). Además, hemos demostrado que los flavonoides también inhiben la producción del T3SS en Pto (Figura 57) al disminuir específicamente los niveles de ARNm de *hrpL*, pero no los de *rpoN* o *hrpRS*, reduciendo de esta manera la expresión de los genes del T3SS controlados por este factor sigma alternativo. Curiosamente, está bien documentado que el T3SS y el aparato de exportación flagelar bacteriano son similares a nivel de la secuencia de las proteínas que los componen y de su ensamblaje, lo que sugiere que ambos sistemas tienen un origen común. Además, llevan a cabo funciones similares (secreción de proteínas) a través del cuerpo basal y muchas de las proteínas son secretadas del mismo modo: utilizando chaperonas específicas o mecanismos moleculares que regulan la longitud y el tamaño del apéndice, el gancho, en el caso del flagelo, y el pilus, en el caso del T3SS (revisado en Erhardt *et al.*, 2010). El presente trabajo expone otra similitud: sus respuestas a los flavonoides, ya que la inhibición de la expresión de *hrpL* y *fliC* se lleva a cabo fundamentalmente a través de la vía de transducción de señal Gac-Rsm.

La función del sistema de dos componentes GacS/GacA en *Pseudomonas* se activa al percibir señales de origen bacteriano y vegetal, muchas de ellas aún desconocidas. En *P. fluorescens* CHA0 dichos compuestos son solubles en disolventes orgánicos, resistentes al calor y sin relación alguna con las moléculas de *quorum sensing* conocidas, como las N-acil homoserina lactonas (Heeb y Haas, 2001; Zuber *et al.*, 2003). Curiosamente, la comunicación célula-célula es posible entre diferentes especies, *Vibrio* y *Pseudomonas*, a través de compuestos de la misma naturaleza (Dubuis y Haas, 2007).

Respecto a los compuestos vegetales, existen evidencias indirectas de que glucósidos fenólicos (arbutina, salicina) pueden actuar como inductores de la vía de transducción de señal GacS/GacA en *P. syringae* pv. *syringae* (Wang *et al.*, 2006). Además, se ha observado que exudados de raíz de remolacha azucarera estimulan la síntesis del lipopéptido cíclico *amphisin* en *Pseudomonas* sp. DSS73, pero no en mutantes carentes de *gacS* (Koch *et al.*, 2002).

Los resultados recogidos en esta tesis nos han permitido proponer un modelo de acción de los flavonoides (Figura 61): la floretina inhibe la función del sistema de dos componentes GacS/GacA en Pto DC3000, lo que provoca una disminución del ARN *rsmY* y, probablemente, un aumento de la concentración celular de uno o varios de los parálogos de RsmA presentes en Pto, que actúan impidiendo la traducción de los ARNm de *hrpL* y *fliC* y promoviendo su degradación. Esto concuerda con lo observado en el mutante *gacA*, donde no se detectó una mayor inhibición de *hrpL* o *fliC* en presencia de floretina o cambios en los niveles de *rsmY* (Figura 58). Sin embargo, no se puede excluir que los ARNs *rsmX1-5* de Pto DC3000 también estén implicados en la respuesta a flavonoides. La presencia de homólogos a RetS y LadS en Pto DC3000 (PSPTO_4868 y PSPTO_4796, respectivamente) sugiere que estas proteínas sensoras también participan en la vía Gac-rsm respondiendo a diferentes señales ambientales. De hecho, en *P. syringae* pv. *syringae* B728a se ha determinado la implicación de RetS y LadS en la regulación del sistema de secreción tipo VI, la producción de EPS, la motilidad tipo *swarming* y virulencia (Records y Gross, 2010).

Inicialmente se pensaba que los ARN de pequeño tamaño (*rsm*) eran redundantes funcionalmente, pero en *P. aeruginosa* y *P. fluorescens* se ha demostrado que no lo son y no parecen serlo tampoco en Pto DC3000 (Martínez-Granero *et al.*, 2012; Petrova y Sauer, 2010). No obstante, son necesarios estudios adicionales para esclarecer cómo tiene lugar la regulación a través del sistema GacS/GacA en Pto DC3000, con siete ARNs reguladores y cinco proteínas homólogas a RsmA. Probablemente, todos ellos responden a diferentes señales y variaciones sutiles en los niveles de los ARN de pequeño tamaño podrían orientarlos a diferentes proteínas de unión, que podrían también expresarse diferencialmente.

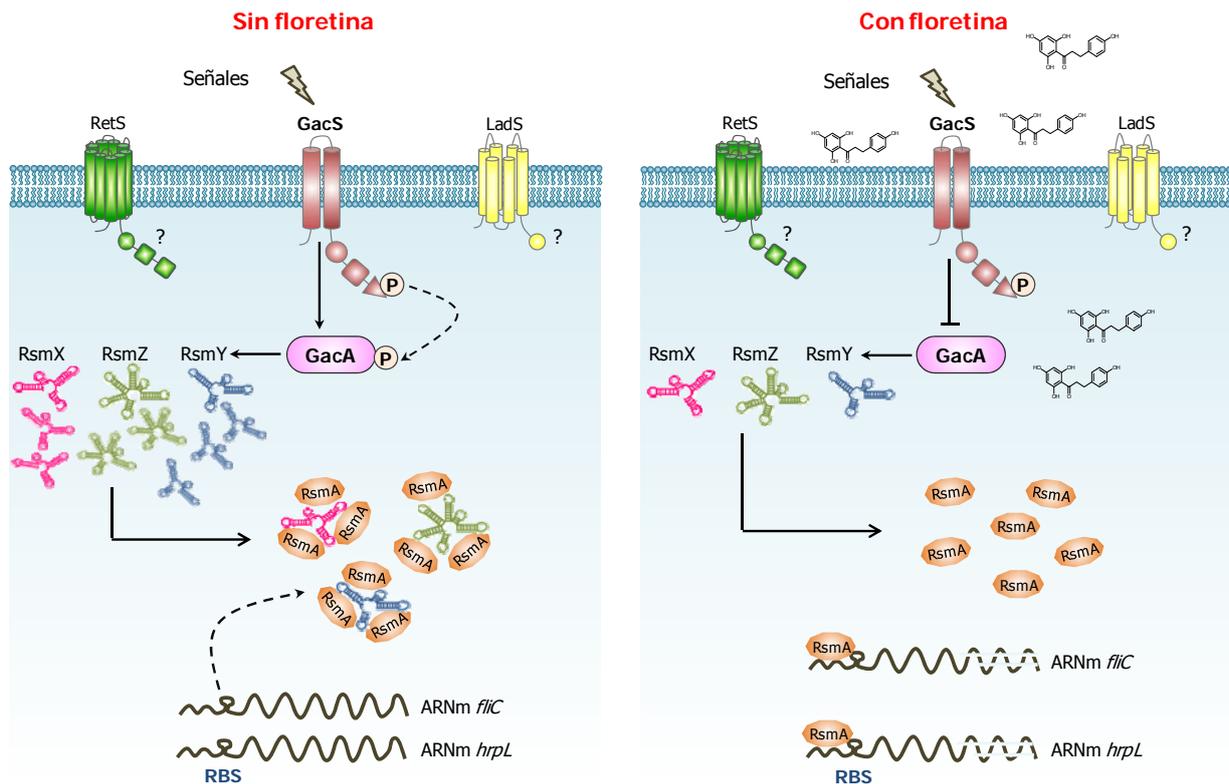


Figura 61. Modelo de acción de los flavonoides en Pto DC3000.

En ausencia de floretina, la fosforilación de GacA por GacS induce la transcripción de los ARNs de pequeño tamaño (*rsmX1-5*, *rsmY*, *rsmZ*), que se unen a las proteínas homólogas a RsmA, lo que permite la traducción de los ARNm de *fliC* y *hrpL*.

En presencia de floretina, se inhibe la función del sistema de dos componentes GacS/GacA, lo que provoca una disminución de los niveles de los ARNs de pequeño tamaño y en especial de *rsmY*. Esto ocasiona un aumento de la concentración celular de uno o varios parálogos de RsmA, que reprimen la traducción de los ARNm de *fliC* y *hrpL* y promueven su degradación.

Es importante mencionar que el efecto de los flavonoides habría pasado desapercibido si no se hubiera utilizado el mutante DC3000A, que carece de la bomba MexAB-OprM. En el primer capítulo de esta tesis se demostró que la floretina, la naringenina y otros flavonoides, inducen el fenotipo de multiresistencia en Pto DC3000 a través del regulador PmeR, con el fin de expulsar esos compuestos de la célula. La acumulación de flavonoides en DC3000A, dado que no son expulsados de la célula por la bomba, provoca una inhibición clara de la motilidad tipo *swimming* y *swarming*, una pérdida significativa de flagelos y una menor expresión de *fliC* y del T3SS que en la cepa silvestre (Figuras 35, 39, 43-45, 56 y 57). La complementación del mutante DC3000A con los genes *mexAB-oprM* revirtió esos efectos. De forma similar, en *S. enterica*, la interrupción del transportador MDR AcrAB-TolC, que desempeña un papel esencial en la resistencia a colorantes básicos, detergentes y antibióticos (Baucheron *et al.*, 2004), reduce la expresión de genes de motilidad y quimiotaxis, de los genes del T3SS y proteínas efectoras asociadas (Webber *et al.*, 2009).

En DC3000A, los flavonoides no solo causan una reducción severa de la producción de flagelina (Figura 46), sino que también inhiben la expresión de *fliA*, disminuyendo aún más la expresión de *fliC* (Figura 50). Es decir, parece que los flavonoides actúan a dos niveles: en primer lugar, disminuyen la estabilidad del ARNm de *fliC* a través de la vía Gac-Rsm y, en segundo lugar y como consecuencia de una mayor acumulación, provocan un descenso de los niveles intracelulares de FliA. Al resultar limitante la cantidad de FliA disponible para unirse al núcleo de la ARN polimerasa, la expresión de los genes dependientes de este factor sigma también decae (Figura 51). Curiosamente, en el mutante DC3000A la expresión de *fliC* es diferente a la de la cepa silvestre ya que, incluso en ausencia de floretina pero más en su presencia, los niveles de ARNm disminuyen claramente (Figuras 44 y 45), lo que coincide con la reducción en el número de flagelos observada en este mutante, tanto en ausencia como en presencia de floretina (Figura 43). Pensamos que algún o algunos metabolitos celulares podrían acumularse en DC3000A causando el mismo efecto que la floretina; sin embargo y pese a que se ha intentado identificar esos compuestos que podrían ser sustratos de MexAB-OprM por diferentes métodos, no ha sido posible hasta el momento.

El apoplasto vegetal es un espacio en el que tiene lugar una carrera de armamento entre plantas y bacterias. Las plantas reconocen y contrarrestan la actividad de los patógenos y utilizan para su defensa diferentes compuestos antimicrobianos que incorporan a sus estructuras celulares o secretan al apoplasto. Por tanto, los flavonoides constituyen una primera línea de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos, de modo que su efecto inhibitor sobre la motilidad bacteriana y la secreción de factores de virulencia podría prevenir o retrasar la infección. Sin embargo, las bacterias han evolucionado desarrollando mecanismos para evitar la acumulación intracelular de flavonoides, que tiene efectos nocivos, y combatir las defensas de las plantas. Pto DC3000 posee una gran resistencia intrínseca a diferentes compuestos antimicrobianos gracias a bombas como MexAB-OprM, por lo que es capaz de sobrevivir en el entorno de la planta e iniciar la infección. Esto le permite, en una segunda etapa, translocar los efectores a las células vegetales mediante el T3SS, bloqueando así la producción de nuevos compuestos con actividad antibacteriana. Se ha demostrado que el T3SS y quizá otros factores de virulencia bajo el control de HrpL (pero no la coronatina) son necesarios para el bloqueo de la síntesis o exudación de algunos compuestos antimicrobianos (Bais *et al.*, 2005). Recientemente también se ha demostrado que el efector HopZ1 favorece la multiplicación de *P. syringae* en soja actuando a nivel de la enzima 2-hidroxi-isoflavona deshidratasa (GmHID1), implicada en la biosíntesis de isoflavonoides (Zhou *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en esta tesis indican que Pto DC3000 posee un mecanismo a prueba de fallos para superar las defensas del hospedador, ya que detecta y responde a los flavonoides por, al menos, una vía de señalización (Gac-rsm) y dos cascadas de expresión génica (flagelos y T3SS), induciendo al mismo tiempo la expresión del sistema MexAB-OprM. Por tanto, podemos considerar que los flavonoides actúan como moléculas señal en el diálogo molecular entre la planta y el patógeno.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos y expuestos en esta memoria han permitido establecer las siguientes conclusiones:

1. La bomba MexAB-OprM está implicada en la resistencia intrínseca de *P. syringae* pv. tomato DC3000 a múltiples antibióticos, como ácido nalidíxico, ampicilina, carbenicilina, cefotaxima, cloranfenicol, norfloxacin, piperacilina y tetraciclina, a biocidas, como metil y butilparabeno, a agentes mutagénicos, como el bromuro de etidio y, en especial, a varios flavonoides, como (+)-catequina, morina, naringenina, floridzina y floretina.
2. El transportador MexAB-OprM contribuye a la colonización de las plantas de tomate por Pto DC3000 y le permite competir eficientemente en su nicho ecológico.
3. Los genes estructurales *mexAB-oprM* forman una unidad transcripcional.
4. *mexAB-oprM* y *pmeR* se expresan *in vivo* a un nivel basal relativamente alto y moderado, respectivamente, que, en ambos casos, aumenta en presencia de diferentes flavonoides y otros compuestos, como butil y metilparabeno.
5. PmeR es el represor local del operón *mexAB-oprM* y de su propio gen *pmeR*.
6. La proteína PmeR es un homodímero estable de 54,4 kDa en solución.
7. El operador de PmeR se encuentra localizado en la región intergénica *pmeR-mexA*, entre las regiones -35 y -10 de $P_{mexAB-oprM}$ y solapando con la región -10 de P_{pmeR} y con el inicio de su transcripción. Es una secuencia pseudopalindrómica de 22 pb y se sitúa entre las posiciones -11 y -38 de $P_{mexAB-oprM}$.
8. La inducción de la expresión de los promotores $P_{mexAB-oprM}$ y P_{pmeR} es consecuencia de la desrepresión de los mismos mediada por la unión de PmeR a efectores estructuralmente diferentes. Esto induce un cambio conformacional en la proteína que interfiere con su capacidad de unión al ADN, lo que provoca su disociación del operador.
9. Pto DC3000 presenta motilidad tipo *swimming* y *swarming*, ambas absolutamente dependientes de flagelo. Los *pili* tipo IV parecen tener un papel accesorio.
10. Los flavonoides, particularmente la floretina y la naringenina, provocan una reducción de los niveles celulares de ARNm de *fliC* y, por tanto, de flagelina. Esto se traduce en un descenso del número de flagelos por célula y en la disminución de la motilidad tanto *swimming* como *swarming* en Pto DC3000.
11. En el mutante DC3000A los flavonoides también inhiben la expresión de *fliA*, lo que origina una drástica disminución de la expresión de *fliC* y de la síntesis de flagelina y flagelos.
12. La floretina inhibe la expresión del sistema de secreción tipo III en condiciones de inducción, reduciendo específicamente los niveles de ARNm de *hrpL*.

13. La inhibición de la expresión de *fliC* y *hrpL* por flavonoides tiene lugar fundamentalmente a través de la vía de transducción de señal Gac-Rsm y concretamente a través del ARN regulador *rsmY*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abramovitch, R.B., y Martin, G.B.** 2004. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* 7: 356-364.
- Abril, M.A., Michan, C., Timmis, K.N., y Ramos, J.L.** 1989. Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J Bacteriol* 171: 6782-6790.
- Alarcon-Chaidez, F.J., Keith, L., Zhao, Y., y Bender, C.L.** 2003. RpoN (σ^{54}) is required for plasmid-encoded coronatine biosynthesis in *Pseudomonas syringae*. *Plasmid* 49: 106-117.
- Aldridge, P., Karlinsey, J., y Hughes, K.T.** 2003. The type III secretion chaperone FlgN regulates flagellar assembly via a negative feedback loop containing its chaperone substrates FlgK and FlgL. *Mol Microbiol* 49: 1333-1345.
- Alfano, J.R., y Collmer, A.** 1997. The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins, and death. *J Bacteriol* 179: 5655-5662.
- Alfano, J.R., Charkowski, A.O., Deng, W.L., Badel, J.L., Petnicki-Ocwieja, T., van Dijk, K., y Collmer, A.** 2000. The *Pseudomonas syringae* Hrp pathogenicity island has a tripartite mosaic structure composed of a cluster of type III secretion genes bounded by exchangeable effector and conserved effector loci that contribute to parasitic fitness and pathogenicity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4856-4861.
- Alfano, J.R., y Collmer, A.** 2004. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* 42: 385-414.
- Alguel, Y., Meng, C., Terán, W., Krell, T., Ramos, J.L., Gallegos, M.T., y Zhang, X.** 2007. Crystal structures of multidrug binding protein TtgR in complex with antibiotics and plant antimicrobials. *J Mol Biol* 369: 829-840.
- Almeida, N.F., Yan, S., Lindeberg, M., Studholme, D.J., Schneider, D.J., Condon, B., Liu, H., Viana, C.J., Warren, A., Evans, C. et al.** 2009. A draft genome sequence of *Pseudomonas syringae* pv. tomato T1 reveals a type III effector repertoire significantly divergent from that of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 52-62.
- Alonso, A., Morales, G., Escalante, R., Campanario, E., Sastre, L., y Martinez, J.L.** 2004. Overexpression of the multidrug efflux pump SmeDEF impairs *Stenotrophomonas maltophilia* physiology. *J Antimicrob Chemother* 53: 432-434.
- Altschul, S.F., y Koonin, E.V.** 1998. Iterated profile searches with PSI-BLAST—a tool for discovery in protein databases. *Trends Biochem Sci* 23: 444-447.
- Amsterdam, D.** 1991. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In *Antibiotics in laboratory medicine*, 3rd ed Lorian, V. (ed). Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 53-105.
- Anderson, J.K., Smith, T.G., y Hoover, T.R.** 2010. Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. *Trends Microbiol* 18: 30-37.
- Apel, D., y Surette, M.G.** 2008. Bringing order to a complex molecular machine: The assembly of the bacterial flagella. *Biochim Biophys Acta* 1778: 1851-1858.
- Aramaki, H., Yagi, N., y Suzuki, M.** 1995. Residues important for the function of a multihelical DNA binding domain in the new transcription factor family of Cam and Tet repressors. *Protein Eng* 8: 1259-1266.
- Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., y Ramphal, R.** 1997. A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* in a cascade manner. *J Bacteriol* 179: 5574-5581.

- Arrebola, E., Cazorla, F., Codina, J., Gutiérrez-Barranquero, J., Pérez-García, A., y de Vicente, A.** 2009. Contribution of mangotoxin to the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Int Microbiol* 12: 87-95.
- Bais, H.P., Prithiviraj, B., Jha, A.K., Ausubel, F.M., y Vivanco, J.M.** 2005. Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* 434: 217-221.
- Baltrus, D.A., Nishimura, M.T., Romanchuk, A., Chang, J.H., Mukhtar, M.S., Cherkis, K., Roach, J., Grant, S.R., Jones, C.D., y Dangl, J.L.** 2011. Dynamic evolution of pathogenicity revealed by sequencing and comparative genomics of 19 *Pseudomonas syringae* isolates. *PLoS Pathog* 7: e1002132.
- Barabote, R.D., Johnson, O.L., Zetina, E., San Francisco, S.K., Fralick, J.A., y San Francisco, M.J.** 2003. *Erwinia chrysanthemi tolC* is involved in resistance to antimicrobial plant chemicals and is essential for phytopathogenesis. *J Bacteriol* 185: 5772-5778.
- Baranova, N., y Nikaido, H.** 2002. The *baeSR* two-component regulatory system activates transcription of the *yegMNOB* (*mdtABCD*) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J Bacteriol* 184: 4168-4176.
- Bardy, S.L., Ng, S.Y., y Jarrell, K.F.** 2003. Prokaryotic motility structures. *Microbiology* 149: 295-304.
- Barta, T.M., Kinscherf, T.G., y Willis, D.K.** 1992. Regulation of tabtoxin production by the *lemA* gene in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 174: 3021-3029.
- Barta, T.M., Kinscherf, T.G., Uchytíl, T.F., y Willis, D.K.** 1993. DNA sequence and transcriptional analysis of the *tbIA* gene required for tabtoxin biosynthesis by *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* 59: 458-466.
- Baucheron, S., Tyler, S., Boyd, D., Mulvey, M.R., Chaslus-Dancla, E., y Cloeckaert, A.** 2004. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3729-3735.
- Bednarek, P., y Osbourn, A.** 2009. Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* 324: 746-748.
- Bender, C.L., Alarcón-Chaidez, F., y Gross, D.C.** 1999. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 266-292.
- Bernard, F.X., Sablé, S., Cameron, B., Provost, J., Desnottes, J.F., Crouzet, J., y Blanche, F.** 1997. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 992-998.
- Berti, A.D., Greve, N.J., Christensen, Q.H., y Thomas, M.G.** 2007. Identification of a biosynthetic gene cluster and the six associated lipopeptides involved in swarming motility of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *J Bacteriol* 189: 6312-6323.
- Blatny, J.M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H.C., Haugan, K., y Valla, S.** 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl Environ Microbiol* 63: 370-379.
- Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., y Haas, D.** 1999. Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14073-14078.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

- Bretz, J., Losada, L., Lisboa, K., y Hutcheson, S.W.** 2002. Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* 45: 397-409.
- Brooks, B.E., Piro, K.M., y Brennan, R.G.** 2007. Multidrug-binding transcription factor QacR binds the bivalent aromatic diamidines DB75 and DB359 in multiple positions. *J Am Chem Soc* 129: 8389-8395.
- Brooks, D.M., Hernandez-Guzman, G., Kloek, A.P., Alarcon-Chaidez, F., Sreedharan, A., Rangaswamy, V., Penaloza-Vazquez, A., Bender, C.L., y Kunkel, B.N.** 2004. Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 162-174.
- Buckley, A.M., Webber, M.A., Cooles, S., Randall, L.P., La Ragione, R.M., Woodward, M.J., y Piddock, L.J.** 2006. The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol* 8: 847-856.
- Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F. et al.** 2003. The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10181-10186.
- Burch, A.Y., Shimada, B.K., Mullin, S.W.A., Dunlap, C.A., Bowman, M.J., y Lindow, S.E.** 2012. *Pseudomonas syringae* coordinates production of a motility-enabling surfactant with flagellar assembly. *J Bacteriol* 194: 1287-1298.
- Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C., y O'Gara, F.** 2006. Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* 152: 405-418.
- Burse, A., Weingart, H., y Ullrich, M.S.** 2004a. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 43-54.
- Burse, A., Weingart, H., y Ullrich, M.S.** 2004b. NorM, an *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in in vitro competition with other epiphytic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70: 693-703.
- Büttner, D., y He, S.Y.** 2009. Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria. *Plant Physiol* 150: 1656-1664.
- Cai, R., Yan, S., Liu, H., Leman, S., y Vinatzer, B.A.** 2011. Reconstructing host range evolution of bacterial plant pathogens using *Pseudomonas syringae* pv. tomato and its close relatives as a model. *Infect Genet Evol* 11: 1738-1751.
- Carey, M., y Smale, S.T.** 2007. Methylation interference assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2007: pdb.prot4812.
- Clark, W.A.** 1976. A simplified Leifson flagella stain. *J Clin Microbiol* 3: 632-634.
- Compeau, G., Al-Achi, B.J., Platsouka, E., y Levy, S.B.** 1988. Survival of rifampin-resistant mutants of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* in soil systems. *Appl Environ Microbiol* 54: 2432-2438.
- Cuppels, D.A.** 1986. Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Appl Environ Microbiol* 51: 323-327.
- Cuppels, D.A., y Ainsworth, T.** 1995. Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Pseudomonas syringae* pv. maculicola strains that produce the phytotoxin coronatine. *Appl Environ Microbiol* 61: 3530-3536.
- Cushnie, T.P.T., y Lamb, A.J.** 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 26: 343-356.
- Cushnie, T.P.T., y Lamb, A.J.** 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 38: 99-107.

- Chan, Y.Y., Bian, H.S., Tan, T.M., Mattmann, M.E., Geske, G.D., Igarashi, J., Hatano, T., Suga, H., Blackwell, H.E., y Chua, K.L. 2007. Control of quorum sensing by a *Burkholderia pseudomallei* multidrug efflux pump. *J Bacteriol* 189: 4320-4324.
- Chatterjee, A., Cui, Y., y Chatterjee, A.K. 2002. Regulation of *Erwinia carotovora* *hrp*_{L_{Ecc}} (*sigma*-L_{Ecc}), which encodes an extracytoplasmic function subfamily of sigma factor required for expression of the HRP regulon. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 971-980.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Yang, H., Collmer, A., Alfano, J.R., y Chatterjee, A.K. 2003. GacA, the response regulator of a two-component system, acts as a master regulator in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 by controlling regulatory RNA, transcriptional activators, and alternate sigma factors. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 1106-1117.
- Chatterjee, A., Cui, Y., Hasegawa, H., y Chatterjee, A.K. 2007. PsrA, the *Pseudomonas* sigma regulator, controls regulators of epiphytic fitness, quorum-sensing signals, and plant interactions in *Pseudomonas syringae* pv. tomato strain DC3000. *Appl Environ Microbiol* 73: 3684-3694.
- Chilcott, G.S., y Hughes, K.T. 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 694-708.
- Chinnam, N., Dadi, P.K., Sabri, S.A., Ahmad, M., Kabir, M.A., y Ahmad, Z. 2010. Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner. *Int J Biol Macromol* 46: 478-486.
- Choi, K.-H., Kumar, A., y Schweizer, H.P. 2006. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* 64: 391-397.
- Choi, O., Yahiro, K., Morinaga, N., Miyazaki, M., y Noda, M. 2007. Inhibitory effects of various plant polyphenols on the toxicity of Staphylococcal α -toxin. *Microb Pathog* 42: 215-224.
- Chuanchuen, R., Narasaki, C.T., y Schweizer, H.P. 2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J Bacteriol* 184: 5036-5044.
- Dasgupta, N., Arora, S.K., y Ramphal, R. 2000. *fleN*, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182: 357-364.
- Dasgupta, N., y Ramphal, R. 2001. Interaction of the antiactivator FleN with the transcriptional activator FleQ regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183: 6636-6644.
- Dasgupta, N., Ferrell, E.P., Kanack, K.J., West, S.E., y Ramphal, R. 2002. *fleQ*, the gene encoding the major flagellar regulator of *Pseudomonas aeruginosa*, is σ^{70} dependent and is downregulated by Vfr, a homolog of *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol* 184: 5240-5250.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S., y Ramphal, R. 2003. A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 50: 809-824.
- De la Torre-Zavala, S., Aguilera, S., Ibarra-Laclette, E., Hernandez-Flores, J.L., Hernandez-Morales, A., Murillo, J., y Alvarez-Morales, A. 2011. Gene expression of Pht cluster genes and a putative non-ribosomal peptide synthetase required for phaseolotoxin production is regulated by GacS/GacA in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Res Microbiol* 162: 488-498.
- De Weger, L.A., van der Vlugt, C.I., Wijffes, A.H., Bakker, P.A., Schippers, B., y Lugtenberg, B. 1987. Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J Bacteriol* 169: 2769-2773.

- Delehanty, J.B., Johnson, B.J., Hickey, T.E., Pons, T., y Ligler, F.S.** 2007. Binding and neutralization of lipopolysaccharides by plant proanthocyanidins. *J Nat Prod* 70: 1718-1724.
- Dixon, R.A., Lamb, C.J., Masoud, S., Sewalt, V.J., y Paiva, N.L.** 1996. Metabolic engineering: prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses - a review. *Gene* 179: 61-71.
- Dixon, R.A.** 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-847.
- Dubuis, C., y Haas, D.** 2007. Cross-species GacA-controlled induction of antibiosis in *Pseudomonads*. *Appl Environ Microbiol* 73: 650-654.
- Dulla, G., Marco, M., Quinones, B., y Lindow, S.A.** 2005. A closer look at *Pseudomonas syringae* as a leaf colonist. *ASM News* 71: 469-475.
- Elkins, C.A., y Nikaido, H.** 2003. 3D structure of AcrB: the archetypal multidrug efflux transporter of *Escherichia coli* likely captures substrates from periplasm. *Drug Resist Updat* 6: 9-13.
- Elkins, C.A., y Mullis, L.B.** 2006. Mammalian steroid hormones are substrates for the major RND- and MFS-type tripartite multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188: 1191-1195.
- Erhardt, M., Namba, K., y Hughes, K.T.** 2010. Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: 6.
- Eswaran, J., Koronakis, E., Higgins, M.K., Hughes, C., y Koronakis, V.** 2004. Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr Opin Struct Biol* 14: 741-747.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J., y Poole, K.** 1998. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180: 5443-5447.
- Evans, K., y Poole, K.** 1999. The MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* is growth-phase regulated. *FEMS Microbiol Lett* 173: 35-39.
- Feil, H., Feil, W.S., Chain, P., Larimer, F., DiBartolo, G., Copeland, A., Lykidis, A., Trong, S., Nolan, M., Goltsman, E. et al.** 2005. Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11064-11069.
- Feldman, M.F., y Cornelis, G.R.** 2003. The multitasking type III chaperones: all you can do with 15 kDa. *FEMS Microbiol Lett* 219: 151-158.
- Fellay, R., Frey, J., y Krisch, H.** 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* 52: 147-154.
- Ferreira, A.O., Myers, C.R., Gordon, J.S., Martin, G.B., Vencato, M., Collmer, A., Wehling, M.D., Alfano, J.R., Moreno-Hagelsieb, G., Lamboy, W.F. et al.** 2006. Whole-genome expression profiling defines the HrpL regulon of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, allows de novo reconstruction of the Hrp *cis* element, and identifies novel coregulated genes. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 1167-1179.
- Ferris, H.U., y Minamino, T.** 2006. Flipping the switch: bringing order to flagellar assembly. *Trends Microbiol* 14: 519-526.
- Filiatrault, M.J., Stodghill, P.V., Myers, C.R., Bronstein, P.A., Butcher, B.G., Lam, H., Grills, G., Schweitzer, P., Wang, W., Schneider, D.J. et al.** 2011. Genome-wide identification of transcriptional start sites in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* str. DC3000. *PLoS ONE* 6: e29335.
- Fouts, D.E., Abramovitch, R.B., Alfano, J.R., Baldo, A.M., Buell, C.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., D'Ascenzo, M., Gwinn, M.L., Lazarowitz, S.G. et al.** 2002. Genomewide identification of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 promoters controlled by the HrpL alternative sigma factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2275-2280.

- Fouts, D.E., Badel, J.L., Ramos, A.R., Rapp, R.A., y Collmer, A. 2003. A *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Hrp (Type III secretion) deletion mutant expressing the Hrp system of bean pathogen *P. syringae* pv. *syringae* 61 retains normal host specificity for tomato. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 43-52.
- Fraser, G.M., Bennett, J.C., y Hughes, C. 1999. Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly. *Mol Microbiol* 32: 569-580.
- Frisk, A., Jyot, J., Arora, S.K., y Ramphal, R. 2002. Identification and functional characterization of *flgM*, a gene encoding the anti-sigma 28 factor in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184: 1514-1521.
- Fukumori, F., Hirayama, H., Takami, H., Inoue, A., y Horikoshi, K. 1998. Isolation and transposon mutagenesis of a *Pseudomonas putida* KT2442 toluene-resistant variant: involvement of an efflux system in solvent resistance. *Extremophiles* 2: 395-400.
- Galán, J.E., y Collmer, A. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* 284: 1322-1328.
- Gardan, L., Shafik, H., Belouin, S., Broch, R., Grimont, F., y Grimont, P.A.D. 1999. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959). *Int J Syst Bacteriol* 49: 469-478.
- Glickmann, E., Gardan, L., Jacquet, S., Hussain, S., Elasri, M., Petit, A., y Dessaux, Y. 1998. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 156-162.
- González-Pasayo, R., y Martínez-Romero, E. 2000. Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 572-577.
- Goodman, A.L., Kulasekara, B., Rietsch, A., Boyd, D., Smith, R.S., y Lory, S. 2004. A signaling network reciprocally regulates genes associated with acute infection and chronic persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Dev Cell* 7: 745-754.
- Goodman, A.L., Merighi, M., Hyodo, M., Ventre, I., Filloux, A., y Lory, S. 2009. Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen. *Genes Dev* 23: 249-259.
- Gradisar, H., Pristovsek, P., Plaper, A., y Jerala, R. 2007. Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *J Med Chem* 50: 264-271.
- Grimm, C., Aufsatz, W., y Panopoulos, N.J. 1995. The *hrpRS* locus of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola constitutes a complex regulatory unit. *Mol Microbiol* 15: 155-165.
- Grkovic, S., Brown, M.H., Roberts, N.J., Paulsen, I.T., y Skurray, R.A. 1998. QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *J Biol Chem* 273: 18665-18673.
- Grkovic, S., Brown, M.H., Schumacher, M.A., Brennan, R.G., y Skurray, R.A. 2001a. The Staphylococcal QacR multidrug regulator binds a correctly spaced operator as a pair of dimers. *J Bacteriol* 183: 7102-7109.
- Grkovic, S., Brown, M.H., y Skurray, R.A. 2001b. Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* 12: 225-237.
- Guilfoile, P.G., y Hutchinson, C.R. 1992. The *Streptomyces glaucescens* TcmR protein represses transcription of the divergently oriented *tcmR* and *tcmA* genes by binding to an intergenic operator region. *J Bacteriol* 174: 3659-3666.
- Gunasekera, T.S., y Sundin, G.W. 2006. Role of nucleotide excision repair and photoreactivation in the solar UVB radiation survival of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a. *J Appl Microbiol* 100: 1073-1083.

- Haefele, D.M., y Lindow, S.E.** 1987. Flagellar motility confers epiphytic fitness advantages upon *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* 53: 2528-2533.
- Hagemeyer, J., Schneider, B., Oldham, N.J., y Hahlbrock, K.** 2001. Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 753-758.
- Hall, T.A.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41: 95-98.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Haraguchi, H., Tanimoto, K., Tamura, Y., Mizutani, K., y Kinoshita, T.** 1998. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry* 48: 125-129.
- Hattermann, D.R., y Ries, S.M.** 1989. Motility of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in infection. *Phytopathology* 79: 284-289.
- Hearn, E.M., Dennis, J.J., Gray, M.R., y Foght, J.M.** 2003. Identification and characterization of the *emhABC* efflux system for polycyclic aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas fluorescens* cLP6a. *J Bacteriol* 185: 6233-6240.
- Heeb, S., y Haas, D.** 2001. Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 1351-1363.
- Heeb, S., Blumer, C., y Haas, D.** 2002. Regulatory RNA as mediator in GacA/RsmA-dependent global control of exoproduct formation in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* 184: 1046-1056.
- Heeb, S., Kuehne, S.A., Bycroft, M., Crivii, S., Allen, M.D., Haas, D., Cámara, M., y Williams, P.** 2006. Functional analysis of the post-transcriptional regulator RsmA reveals a novel RNA-binding site. *J Mol Biol* 355: 1026-1036.
- Helbl, V., Berens, C., y Hillen, W.** 1995. Proximity probing of Tet repressor to *tet* operator by dimethylsulfate reveals protected and accessible functions for each recognized base-pair in the major groove. *J Mol Biol* 245: 538-548.
- Hendrickson, E.L., Guevera, P., y Ausubel, F.M.** 2000a. The alternative sigma factor RpoN is required for *hrp* activity in *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and acts at the level of *hrpL* transcription. *J Bacteriol* 182: 3508-3516.
- Hendrickson, E.L., Guevera, P., Peñaloza-Vázquez, A., Shao, J., Bender, C., y Ausubel, F.M.** 2000b. Virulence of the phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is *rpoN* dependent. *J Bacteriol* 182: 3498-3507.
- Hernández, A., Maté, M.J., Sánchez-Díaz, P.C., Romero, A., Rojo, F., y Martínez, J.L.** 2009. Structural and functional analysis of SmeT, the repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *J Biol Chem* 284: 14428-14438.
- Heurlier, K., Williams, F., Heeb, S., Dormond, C., Pessi, G., Singer, D., Camara, M., Williams, P., y Haas, D.** 2004. Positive control of swarming, rhamnolipid synthesis, and lipase production by the posttranscriptional RsmA/RsmZ system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 186: 2936-2945.
- Hidalgo, G., Chan, M., y Tufenkji, N.** 2011. Inhibition of *Escherichia coli* CFT073 *fliC* expression and motility by cranberry materials. *Appl Environ Microbiol* 77: 6852-6857.
- Hillen, W., y Berens, C.** 1994. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol* 48: 345-369.

- Hirakawa, H., Inazumi, Y., Masaki, T., Hirata, T., y Yamaguchi, A. 2005. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 55: 1113-1126.
- Hirano, S.S., Ostertag, E.M., Savage, S.A., Baker, L.S., Willis, D.K., y Upper, C.D. 1997. Contribution of the regulatory gene *lemA* to field fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl Environ Microbiol* 63: 4304-4312.
- Hirano, S.S., y Upper, C.D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* -a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 624-653.
- Hirooka, K., Kunikane, S., Matsuoka, H., Yoshida, K.-I., Kumamoto, K., Tojo, S., y Fujita, Y. 2007. Dual regulation of the *Bacillus subtilis* regulon comprising the *lmrAB* and *yxaGH* operons and *yxaF* gene by two transcriptional repressors, LmrA and YxaF, in response to flavonoids. *J Bacteriol* 189: 5170-5182.
- Hrabak, E.M., y Willis, D.K. 1992. The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *J Bacteriol* 174: 3011-3020.
- Hrabak, E.M., y Willis, D.K. 1993. Involvement of the *lemA* gene in production of syringomycin and protease by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* 6: 368-375.
- Hu, W., Yuan, J., Jin, Q.-L., Hart, P., y He, S.Y. 2001. Immunogold labeling of Hrp pili of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* assembled in minimal medium and in planta. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 234-241.
- Hueck, C.J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 379-433.
- Humair, B., Wackwitz, B., y Haas, D. 2010. GacA-controlled activation of promoters for small RNA genes in *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol* 76: 1497-1506.
- Hutcheson, S.W., Bretz, J., Sussan, T., Jin, S.M., y Pak, K. 2001. Enhancer-binding proteins HrpR and HrpS interact to regulate *hrp*-encoded type III protein secretion in *Pseudomonas syringae* strains. *J Bacteriol* 183: 5589-5598.
- Hutchison, M.L., y Gross, D.C. 1997. Lipopeptide phytotoxins produced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. *Mol Plant Microbe Interact* 10: 347-354.
- Huynh, T., Dahlbeck, D., y Staskawicz, B. 1989. Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity. *Science* 245: 1374-1377.
- Ichinose, Y., Shimizu, R., Ikeda, Y., Taguchi, F., Marutani, M., Mukaiharu, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., y Shiraishi, T. 2003. Need for flagella for complete virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*: genetic analysis with flagella-defective mutants $\Delta fliC$ and $\Delta fliD$ in host tobacco plants. *J Gen Plant Pathol* 69: 244-249.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., y Shimamura, T. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochim Biophys Acta* 1147: 132-136.
- Ishihama, A. 1999. Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Genes Cells* 4: 135-143.
- Jin, Q., y He, S.Y. 2001. Role of the Hrp pilus in type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. *Science* 294: 2556-2558.
- Jin, Q., Hu, W., Brown, I., McGhee, G., Hart, P., Jones, A.L., y He, S.Y. 2001. Visualization of secreted Hrp and Avr proteins along the Hrp pilus during type III secretion in *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* 40: 1129-1139.

- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R.W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., DeBoy, R., Durkin, A.S., Giglio, M.G. *et al.* 2005. Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J Bacteriol* 187: 6488-6498.
- Johanesen, P.A., Lyras, D., Bannam, T.L., y Rood, J.I. 2001. Transcriptional analysis of the *tet(P)* operon from *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* 183: 7110-7119.
- Jones, J.D.G., y Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Jovanovic, M., James, E.H., Burrows, P.C., Rego, F.G., Buck, M., y Schumacher, J. 2011. Regulation of the co-evolved HrpR and HrpS AAA+ proteins required for *Pseudomonas syringae* pathogenicity. *Nat Commun* 2, 177.
- Jyot, J., Sonawane, A., Wu, W., y Ramphal, R. 2007. Genetic mechanisms involved in the repression of flagellar assembly by *Pseudomonas aeruginosa* in human mucus. *Mol Microbiol* 63: 1026-1038.
- Kang, H., y Gross, D.C. 2005. Characterization of a resistance-nodulation-cell division transporter system associated with the *syr-syp* genomic island of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl Environ Microbiol* 71: 5056-5065.
- Kawamura-Sato, K., Iinuma, Y., Hasegawa, T., Horii, T., Yamashino, T., y Ohta, M. 2000. Effect of subinhibitory concentrations of macrolides on expression of flagellin in *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 2869-2872.
- Kay, E., Dubuis, C., y Haas, D. 2005. Three small RNAs jointly ensure secondary metabolism and biocontrol in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 17136-17141.
- Kay, E., Humair, B., Denervaud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C., y Haas, D. 2006. Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188: 6026-6033.
- Kearns, D.B. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Micro* 8: 634-644.
- Keith, R.C., Keith, L.M.W., Hernández-Guzmán, G., Uppalapati, S.R., y Bender, C.L. 2003. Alginate gene expression by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in host and non-host plants. *Microbiology* 149: 1127-1138.
- Kieboom, J., Dennis, J.J., Zylstra, G.J., y de Bont, J.A. 1998. Active efflux of organic solvents by *Pseudomonas putida* S12 is induced by solvents. *J Bacteriol* 180: 6769-6772.
- Kieboom, J., y de Bont, J. 2001. Identification and molecular characterization of an efflux system involved in *Pseudomonas putida* S12 multidrug resistance. *Microbiology* 147: 43-51.
- Kim, J., Kim, J.G., Kang, Y., Jang, J.Y., Jog, G.J., Lim, J.Y., Kim, S., Suga, H., Nagamatsu, T., y Hwang, I. 2004. Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Mol Microbiol* 54: 921-934.
- Kim, J.J., y Sundin, G.W. 2000. Regulation of the *ruAB* mutagenic DNA repair operon of *Pseudomonas syringae* by UV-B (290 to 320 Nanometers) radiation and analysis of *ruAB*-mediated mutability *in vitro* and *in planta*. *J Bacteriol* 182: 6137-6144.
- Kinscherf, T.G., y Willis, D.K. 1999. Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires *gacS* (*lemA*) and *gacA* but not the acyl-homoserine lactone biosynthetic gene *ahlI*. *J Bacteriol* 181: 4133-4136.
- Kitten, T., Kinscherf, T.G., McEvoy, J.L., y Willis, D.K. 1998. A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Mol Microbiol* 28: 917-929.

- Klose, K.E., y Mekalanos, J.J. 1998. Distinct roles of an alternative sigma factor during both free-swimming and colonizing phases of the *Vibrio cholerae* pathogenic cycle. *Mol Microbiol* 28: 501-520.
- Koch, B., Nielsen, T.H., Sørensen, D., Andersen, J.B., Christophersen, C., Molin, S., Givskov, M., Sørensen, J., y Nybroe, O. 2002. Lipopeptide production in *Pseudomonas* sp. strain DSS73 is regulated by components of sugar beet seed exudate via the Gac two-component regulatory system. *Appl Environ Microbiol* 68: 4509-4516.
- Kovach, M.E., Phillips, R.W., Elzer, P.H., Roop II, R.M., y Peterson, K.M. 1994. pBBR1MCS: A broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16: 800-802.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E., y Aizawa, S.I. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280: 602-605.
- Kulkarni, P.R., Cui, X., Williams, J.W., Stevens, A.M., y Kulkarni, R.V. 2006. Prediction of CsrA-regulating small RNAs in bacteria and their experimental verification in *Vibrio fischeri*. *Nucleic Acids Res* 34: 3361-3369.
- Kutsukake, K., Ohya, Y., y Iino, T. 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 172: 741-747.
- Lacroix, F.J., Cloeckert, A., Grepinet, O., Pinault, C., Popoff, M.Y., Waxin, H., y Pardon, P. 1996. *Salmonella typhimurium* *acrB*-like gene: identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection. *FEMS Microbiol Lett* 135: 161-167.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lan, L., Deng, X., Xiao, Y., Zhou, J.-M., y Tang, X. 2007. Mutation of Lon protease differentially affects the expression of *Pseudomonas syringae* type III secretion system genes in rich and minimal media and reduces pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 682-696.
- Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F.H.T., y Haas, D. 2008. Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Mol Microbiol* 67: 241-253.
- Laub, M.T., Chen, S.L., Shapiro, L., y McAdams, H.H. 2002. Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4632-4637.
- Laville, J., Voisard, C., Keel, C., Maurhofer, M., Defago, G., y Haas, D. 1992. Global control in *Pseudomonas fluorescens* mediating antibiotic synthesis and suppression of black root rot of tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1562-1566.
- Leach, J.E., y White, F.F. 1996. Bacterial avirulence genes. *Annu Rev Phytopathol* 34: 153-179.
- Lee, S.W., y Edlin, G. 1985. Expression of tetracycline resistance in pBR322 derivatives reduces the reproductive fitness of plasmid-containing *Escherichia coli*. *Gene* 39: 173-180.
- Levy, S.B., y Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10: S122-129.
- Lewis, K. 2001. In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 247-254.
- Li, X.-Z., Starratt, A.N., y Cuppels, D.A. 1998. Identification of tomato leaf factors that activate toxin gene expression in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Phytopathology* 88: 1094-1100.
- Li, X.Z., Zhang, L., y Poole, K. 2002. SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 333-343.

- Li, X.Z., y Nikaido, H. 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69: 1555-1623.
- Li, Y., Peng, Q., Selimi, D., Wang, Q., Charkowski, A.O., Chen, X., y Yang, C.-H. 2009. The plant phenolic compound *p*-coumaric acid represses gene expression in the *Dickeya dadantii* type III secretion system. *Appl Environ Microbiol* 75: 1223-1228.
- Lin, J., Sahin, O., Michel, L.O., y Zhang, Q. 2003. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* 71: 4250-4259.
- Lindeberg, M., Cartinhour, S., Myers, C.R., Schechter, L.M., Schneider, D.J., y Collmer, A. 2006. Closing the circle on the discovery of genes encoding Hrp regulon members and type III secretion system effectors in the genomes of three model *Pseudomonas syringae* strains. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 1151-1158.
- Lindeberg, M., Myers, C.R., Collmer, A., y Schneider, D.J. 2008. Roadmap to new virulence determinants in *Pseudomonas syringae*: insights from comparative genomics and genome organization. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 685-700.
- Lindgren, P.B., Peet, R.C., y Panopoulos, N.J. 1986. Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. "phaseolicola" controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J Bacteriol* 168: 512-522.
- Lindow, S.E., Lahue, E., Govindarajan, A.G., Panopoulos, N.J., y Gies, D. 1989. Localization of ice nucleation activity and the *iceC* gene product in *Pseudomonas syringae* and *Escherichia coli*. *Mol Plant Microbe Interact* 2: 262-272.
- Lindow, S.E., y Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Appl Environ Microbiol* 69: 1875-1883.
- Lisser, S., y Margalit, H. 1993. Compilation of *E.coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 21: 1507-1516.
- Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Lomovskaya, O., Lewis, K., y Martin, A. 1995. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J Bacteriol* 177: 2328-2334.
- Loper, J.E., Hassan, K.A., Mavrodi, D.V., Davis, E.W., II, Lim, C.K., Shaffer, B.T., Elbourne, L.D.H., Stockwell, V.O., Hartney, S.L., Breakwell, K. *et al.* 2012. Comparative genomics of plant-associated *Pseudomonas* spp.: insights into diversity and inheritance of traits involved in multitrophic interactions. *PLoS Genet* 8: e1002784.
- López-Gresa, M.P., Maltese, F., Bellés, J.M., Conejero, V., Kim, H.K., Choi, Y.H., y Verpoorte, R. 2010. Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. *Phytochem Anal* 21: 89-94.
- López-Gresa, M.P., Torres, C., Campos, L., Lisón, P., Rodrigo, I., Bellés, J.M., y Conejero, V. 2011. Identification of defence metabolites in tomato plants infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Environ Exp Bot* 74: 216-228.
- Losada, L.C., y Hutcheson, S.W. 2005. Type III secretion chaperones of *Pseudomonas syringae* protect effectors from Lon-associated degradation. *Mol Microbiol* 55: 941-953.
- Llama-Palacios, A., López-Solanilla, E., y Rodríguez-Palenzuela, P. 2002. The *ybiT* gene of *Erwinia chrysanthemi* codes for a putative ABC transporter and is involved in competitiveness against endophytic bacteria during infection. *Appl Environ Microbiol* 68: 1624-1630.
- Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N.G., Nikaido, H., y Hearst, J.E. 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 6299-6313.
- Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N.G., Nikaido, H., y Hearst, J.E. 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 16: 45-55.

- Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H., y Hearst, J.E.** 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol* 19: 101-112.
- Macnab, R.M.** 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 57: 77-100.
- Macnab, R.M.** 2004. Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta* 11: 1-3.
- Madoori, P.K., Agustindari, H., Driessen, A.J., y Thunnissen, A.M.** 2009. Structure of the transcriptional regulator LmrR and its mechanism of multidrug recognition. *EMBO J* 28: 156-166.
- Maggiorani-Valecillos, A., Rodríguez-Palenzuela, P., y López-Solanilla, E.** 2006. The role of several multidrug resistance systems in *Erwinia chrysanthemi* pathogenesis. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 607-613.
- Mahajan, A., Currie, C.G., Mackie, S., Tree, J., McAteer, S., McKendrick, I., McNeilly, T.N., Roe, A., La Ragione, R.M., Woodward, M.J. et al.** 2009. An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157 : H7 with bovine intestinal epithelium. *Cell Microbiol* 11: 121-137.
- Marco, M.L., Legac, J., y Lindow, S.E.** 2005. *Pseudomonas syringae* genes induced during colonization of leaf surfaces. *Environ Microbiol* 7: 1379-1391.
- Martin, R.G., y Rosner, J.L.** 1995. Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5456-5460.
- Martin, R.G., y Rosner, J.L.** 2002. Genomics of the *marA/soxS/rob* regulon of *Escherichia coli*: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data. *Mol Microbiol* 44: 1611-1624.
- Martínez-Granero, F., Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., y Martín, M.** 2012. The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS ONE* 7: e31765.
- Martínez, J.L., Sánchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., y Alvarez-Ortega, C.** 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* 33: 430-449.
- Marutani, M., Taguchi, F., Ogawa, Y., Hossain, M., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., y Ichinose, Y.** 2008. Gac two-component system in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* is required for virulence but not for hypersensitive reaction. *Mol Genet Genomics* 279: 313-322.
- Matilla, M.A., Ramos, J.L., Duque, E., De Dios Alché, J., Espinosa-Urgel, M., y Ramos-González, M.I.** 2007. Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 9: 1842-1850.
- Mazzola, M., y White, F.F.** 1994. A mutation in the indole-3-acetic acid biosynthesis pathway of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* affects growth in *Phaseolus vulgaris* and syringomycin production. *J Bacteriol* 176: 1374-1382.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., y He, S.Y.** 2006. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980.
- Merino, S., Shaw, J.G., y Tomas, J.M.** 2006. Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS Microbiol Lett* 263: 127-135.
- Miller, J.** 1972. *Experiments in molecular genetics*. New York: Cold Spring Harbor
- Minamino, T., y Macnab, R.M.** 1999. Components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and classification of export substrates. *J Bacteriol* 181: 1388-1394.

- Minamino, T., y Macnab, R.M.** 2000. Domain structure of *Salmonella* FlhB, a flagellar export component responsible for substrate specificity switching. *J Bacteriol* 182: 4906-4914.
- Minamino, T., Imada, K., y Namba, K.** 2008. Mechanisms of type III protein export for bacterial flagellar assembly. *Mol Biosyst* 4: 1105-1115.
- Mo, Y.Y., y Gross, D.C.** 1991. Plant signal molecules activate the *syrB* gene, which is required for syringomycin production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J Bacteriol* 173: 5784-5792.
- Moll, S., Schneider, D.J., Stodghill, P., Myers, C.R., Cartinhour, S.W., y Filiatrault, M.J.** 2010. Construction of an *rsmX* co-variance model and identification of five *rsmX* non-coding RNAs in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *RNA Biol* 7: 508-516.
- Monier, J.M., y Lindow, S.E.** 2003. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15977-15982.
- Monier, J.M., y Lindow, S.E.** 2004. Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Appl Environ Microbiol* 70: 346-355.
- Moriya, N., Minamino, T., Hughes, K.T., Macnab, R.M., y Namba, K.** 2006. The type III flagellar export specificity switch is dependent on FliK ruler and a molecular clock. *J Mol Biol* 359: 466-477.
- Murakami, S., y Yamaguchi, A.** 2003. Multidrug-exporting secondary transporters. *Curr Opin Struct Biol* 13: 443-452.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., y Yamaguchi, A.** 2006. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 443: 173-179.
- Murray, D.S., Schumacher, M.A., y Brennan, R.G.** 2004. Crystal structures of QacR-diamidine complexes reveal additional multidrug-binding modes and a novel mechanism of drug charge neutralization. *J Biol Chem* 279: 14365-14371.
- Murray, T.S., y Kazmierczak, B.I.** 2006. FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188: 6995-7004.
- Natsume, R., Ohnishi, Y., Senda, T., y Horinouchi, S.** 2004. Crystal structure of a γ -butyrolactone autoregulator receptor protein in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Mol Biol* 336: 409-419.
- Navarro-Martínez, M.D., Navarro-Peran, E., Cabezas-Herrera, J., Ruiz-Gomez, J., Garcia-Canovas, F., y Rodríguez-Lopez, J.N.** 2005. Antifolate activity of epigallocatechin gallate against *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2914-2920.
- Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., Martínez-Granero, F., Rivilla, R., y Martín, M.** 2009. Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microb Biotechnol* 2: 489-498.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A.P., Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M. et al.** 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4: 799-808.
- Nguyen, L.C., Taguchi, F., Tran, Q.M., Naito, K., Yamamoto, M., Ohnishi-Kameyama, M., Ono, H., Yoshida, M., Chiku, K., Ishii, T. et al.** 2012. Type IV pilin is glycosylated in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605 and is required for surface motility and virulence. *Mol Plant Pathol* 13: 764-774.
- Nguyen, T.N., Phan, Q.G., Duong, L.P., Bertrand, K.P., y Lenski, R.E.** 1989. Effects of carriage and expression of the Tn10 tetracycline-resistance operon on the fitness of *Escherichia coli* K12. *Mol Biol Evol* 6: 213-225.

- Nikaido, E., Yamaguchi, A., y Nishino, K.** 2008. AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J Biol Chem* 283: 24245-24253.
- Nikaido, H.** 2001. Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol* 12: 215-223.
- Nikaido, H.** 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* 78: 119-146.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y., y Sugino, Y.** 1990. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res* 18: 6169.
- Nishino, K., y Yamaguchi, A.** 2002. EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the *yhiUV* multidrug transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184: 2319-2323.
- Nomura, K., Melotto, M., y He, S.-Y.** 2005. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr Opin Plant Biol* 8: 361-368.
- O'Brien, H.E., Desveaux, D., y Guttman, D.S.** 2011. Next-generation genomics of *Pseudomonas syringae*. *Curr Opin Microbiol* 14: 24-30.
- Oguiza, J.A., y Asensio, A.C.** 2005. The VirPphA/AvrPtoB family of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. *Res Microbiol* 156: 298-303.
- Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M., y Moriyama, Y.** 2006. The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol Sci* 27: 587-593.
- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W., y Hinrichs, W.** 2000. Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat Struct Biol* 7: 215-219.
- Ortiz-Martín, I., Thwaites, R., Mansfield, J.W., y Beuzón, C.R.** 2010. Negative regulation of the Hrp Type III secretion system in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 682-701.
- Osborn, A.E.** 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Österberg, S., Skärfstad, E., y Shingler, V.** 2010. The σ -factor FliA, ppGpp and DksA coordinate transcriptional control of the *aer2* gene of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* 12: 1439-1451.
- Ottemann, K.M., y Miller, J.F.** 1997. Roles for motility in bacterial-host interactions. *Mol Microbiol* 24: 1109-1117.
- Pagès, J.M., Masi, M., y Barbe, J.** 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol Med* 11: 382-389.
- Palumbo, J.D., Kado, C.I., y Phillips, D.A.** 1998. An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J Bacteriol* 180: 3107-3113.
- Palleroni, N.J.** 1984. Genus I *Pseudomonas* Migula 1894. In *The Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, N.R., y Holt, J.G. (eds). Baltimore: Williams & Wilkins Co, pp. 141-199.
- Pandza, S., Baetens, M., Park, C.H., Au, T., Keyhan, M., y Matin, A.** 2000. The G-protein FlhF has a role in polar flagellar placement and general stress response induction in *Pseudomonas putida*. *Mol Microbiol* 36: 414-423.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., y Saier, M.H., Jr.** 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1-34.
- Paulsen, I.T., Skurray, R.A., Tam, R., Saier, M.H., Jr., Turner, R.J., Weiner, J.H., Goldberg, E.B., y Grinius, L.L.** 1996. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol Microbiol* 19: 1167-1175.
- Paulsen, I.T.** 2003. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr Opin Microbiol* 6: 446-451.

- Paulsen, I.T., Press, C.M., Ravel, J., Kobayashi, D.Y., Myers, G.S.A., Mavrodi, D.V., DeBoy, R.T., Seshadri, R., Ren, Q., Madupu, R. *et al.* 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat Biotech* 23: 873-878.
- Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J., Tam, V.C., Chancey, S.T., Shan, L., Jamir, Y., Schechter, L.M., Janes, M.D., Buell, C.R., Tang, X. *et al.* 2002. Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7652-7657.
- Petrova, O.E., y Sauer, K. 2010. The novel two-component regulatory system BfiSR regulates biofilm development by controlling the small RNA *rsmZ* through CafA. *J Bacteriol* 192: 5275-5288.
- Piddock, L.J.V. 2006. Multidrug-resistance efflux pumps? not just for resistance. *Nat Rev Micro* 4: 629-636.
- Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Šolmajer, T., y Jerala, R. 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 530-536.
- Poole, K., Krebs, K., McNally, C., y Neshat, S. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* 175: 7363-7372.
- Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D.E., y Bianco, N. 1996. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2021-2028.
- Poole, K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 255-264.
- Poole, K. 2003. Overcoming multidrug resistance in gram-negative bacteria. *Curr Opin Investig Drugs* 4: 128-139.
- Poole, K. 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* 10: 12-26.
- Poole, K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* 39: 162-176.
- Poole, K. 2008. Bacterial multidrug efflux pumps serve other functions. *Microbe* 3: 179-185.
- Potvin, E., Sanschagrin, F., y Levesque, R.C. 2008. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* 32: 38-55.
- Prentki, P., y Krisch, H.M. 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* 29: 303-313.
- Preston, G., Deng, W.-L., Huang, H.-C., y Collmer, A. 1998. Negative regulation of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* by HrpV. *J Bacteriol* 180: 4532-4537.
- Preston, G.M. 2000. *Pseudomonas syringae* pv. tomato: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Molecular Plant Pathology* 1: 263-275.
- Pueppke, S.G., y VanEtten, H.D. 1976. Accumulation of pisatin and three additional antifungal pterocarpanes in *Fusarium solani*-infected tissues of *Pisum sativum*. *Physiological Plant Pathology* 8: 51-61.
- Pueyo, C., Jurado, J., Prieto-Álamo, M.-J., Monje-Casas, F., y López-Barer, J. 2002. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for determining transcriptional regulation of thioredoxin and glutaredoxin pathways. In *Methods Enzymol.* Helmut, S., y Lester, P. (eds): Academic Press, pp. 441-451.
- Quiñones, B., Dulla, G., y Lindow, S.E. 2005. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact* 18: 682-693.
- Rahmati, S., Yang, S., Davidson, A.L., y Zechiedrich, E.L. 2002. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Mol Microbiol* 43: 677-685.

- Rahme, L.G., Mindrinos, M.N., y Panopoulos, N.J. 1992. Plant and environmental sensory signals control the expression of *hrp* genes in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *J Bacteriol* 174: 3499-3507.
- Ramos, A.R., Morello, J.E., Ravindran, S., Deng, W.-L., Huang, H.-C., y Collmer, A. 2007. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 type III secretion system Hrp proteins that can travel the type III pathway and contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. *J Bacteriol* 189: 5773-5778.
- Ramos, J.L., Duque, E., Huertas, M.J., y Haïdour, A. 1995. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J Bacteriol* 177: 3911-3916.
- Ramos, J.L., Duque, E., Godoy, P., y Segura, A. 1998. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* 180: 3323-3329.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M.I., Rojas, A., Terán, W., y Segura, A. 2002. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 56: 743-768.
- Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R., y Tobes, R. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 326-356.
- Records, A.R., y Gross, D.C. 2010. Sensor kinases RetS and LadS regulate *Pseudomonas syringae* type VI secretion and virulence factors. *J Bacteriol* 192: 3584-3596.
- Reimmann, C., Valverde, C., Kay, E., y Haas, D. 2005. Posttranscriptional repression of GacS/GacA-controlled genes by the RNA-binding protein RsmE acting together with RsmA in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *J Bacteriol* 187: 276-285.
- Ren, Q., Kang, K.H., y Paulsen, I.T. 2004. TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. *Nucleic Acids Res* 32: D284-288.
- Rico, A., y Preston, G.M. 2008. *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 uses constitutive and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 269-282.
- Rich, J.J., Hirano, S.S., y Willis, D.K. 1992. Pathovar-specific requirement for the *Pseudomonas syringae* *lemA* gene in disease lesion formation. *Appl Environ Microbiol* 58: 1440-1446.
- Rich, J.J., Kinscherf, T.G., Kitten, T., y Willis, D.K. 1994. Genetic evidence that the *gacA* gene encodes the cognate response regulator for the *lemA* sensor in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 176: 7468-7475.
- Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., y Ramphal, R. 1995. Cloning and phenotypic characterization of *fleS* and *fleR*, new response regulators of *Pseudomonas aeruginosa* which regulate motility and adhesion to mucin. *Infect Immun* 63: 4868-4876.
- Rodríguez-Herva, J.J., Duque, E., Molina-Henares, M.A., Navarro-Aviles, G., van Dillewijn, P., de la Torre, J., Molina-Henares, A.J., Sanchez-de la Campa, A., Ran, F.A., Segura, A. et al. 2010. Physiological and transcriptomic characterization of a *fliA* mutant of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol Rep* 2: 373-380.
- Rodríguez-Moreno, L., Pineda, M., Soukupová, J., Macho, A., Beuzón, C., Barón, M., y Ramos, C. 2008. Early detection of bean infection by *Pseudomonas syringae* in asymptomatic leaf areas using chlorophyll fluorescence imaging. *Photosynth Res* 96: 27-35.
- Rodríguez-Moreno, L., Jiménez, A.J., y Ramos, C. 2009. Endopathogenic lifestyle of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive knots. *Microb Biotechnol* 2: 476-488.

- Rodriguez-Navarro, D.N., Dardanelli, M.S., y Ruiz-Sainz, J.E. 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol Lett* 272: 127-136.
- Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M., y He, S.Y. 1997. Hrp pilus: An *hrp*-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3459-3464.
- Roine, E., Raineri, D.M., Romantschuk, M., Wilson, M., y Nunn, D.N. 1998. Characterization of type IV pilus genes in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 1048-1056.
- Romantschuk, M., Nurmiaho-Lassila, E.-L., Roine, E., y Suoniemi, A. 1993. Pilus-mediated adsorption of *Pseudomonas syringae* to the surface of host and non-host plant leaves. *J Gen Microbiol* 139: 2251-2260.
- Russell, A.D. 2000. Do biocides select for antibiotic resistance? *J Pharm Pharmacol* 52: 227-233.
- Saier, M.H., Jr., Tran, C.V., y Barabote, R.D. 2006. TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res* 34: D181-186.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, P., Alonso, A., y Martínez, J.L. 2002a. Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3386-3393.
- Sánchez, P., Rojo, F., y Martínez, J.L. 2002b. Transcriptional regulation of *mexR*, the repressor of *Pseudomonas aeruginosa* *mexAB-oprM* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol Lett* 207: 63-68.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Sarkar, S.F., y Guttman, D.S. 2004. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen. *Appl Environ Microbiol* 70: 1999-2012.
- Scholz, O., Köstner, M., Reich, M., Gastiger, S., y Hillen, W. 2003. Teaching TetR to recognize a new inducer. *J Mol Biol* 329: 217-227.
- Schreiber, L., Krimm, U., Knoll, D., Sayed, M., Auling, G., y Kroppenstedt, R.M. 2005. Plant-microbe interactions: identification of epiphytic bacteria and their ability to alter leaf surface permeability. *New Phytologist* 166: 589-594.
- Schubert, M., Lapouge, K., Duss, O., Oberstrass, F.C., Jelesarov, I., Haas, D., y Allain, F.H.T. 2007. Molecular basis of messenger RNA recognition by the specific bacterial repressing clamp RsmA/CsrA. *Nat Struct Mol Biol* 14: 807-813.
- Schumacher, M.A., Miller, M.C., Grkovic, S., Brown, M.H., Skurray, R.A., y Brennan, R.G. 2001. Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. *Science* 294: 2158-2163.
- Schumacher, M.A., y Brennan, R.G. 2002. Structural mechanisms of multidrug recognition and regulation by bacterial multidrug transcription factors. *Mol Microbiol* 45: 885-893.
- Schumacher, M.A., y Brennan, R.G. 2003. Deciphering the molecular basis of multidrug recognition: Crystal structures of the *Staphylococcus aureus* multidrug binding transcription regulator QacR. *Res Microbiol* 154: 69-77.
- Schumacher, M.A., Miller, M.C., y Brennan, R.G. 2004. Structural mechanism of the simultaneous binding of two drugs to a multidrug-binding protein. *EMBO J* 23: 2923-2930.

- Shafer, W.M., Veal, W.L., Lee, E.H., Zarantonelli, L., Balthazar, J.T., y Rouquette, C. 2001. Genetic organization and regulation of antimicrobial efflux systems possessed by *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 219-224.
- Sheahan, J., y Cheong, H. 1998. The colorless flavonoids of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). II. Flavonoid 3' hydroxylation and lipid peroxidation. *Am J Bot* 85: 476.
- Shimizu, R., Taguchi, F., Marutani, M., Mukaihara, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., y Ichinose, Y. 2003. The Δ fliD mutant of *Pseudomonas syringae* pv. tabaci, which secretes flagellin monomers, induces a strong hypersensitive reaction (HR) in non-host tomato cells. *Mol Genet Genomics* 269: 21-30.
- Silby, M., Cerdano-Tarraga, A., Vernikos, G., Giddens, S., Jackson, R., Preston, G., Zhang, X.-X., Moon, C., Gehrig, S., Godfrey, S. et al. 2009. Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol* 10: R51.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B., y Jackson, R.W. 2011. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol Rev* 35: 652-680.
- Sivaneson, M., Mikkelsen, H., Ventre, I., Bordi, C., y Filloux, A. 2011. Two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene expression. *Mol Microbiol* 79: 1353-1366.
- Slimestad, R., Fossen, T., y Verheul, M.J. 2008. The flavonoids of tomatoes. *J Agric Food Chem* 56: 2436-2441.
- Smith, T.G., y Hoover, T.R. 2009. Chapter 8 Deciphering bacterial flagellar gene regulatory networks in the genomic era. In *Adv Appl Microbiol*. Allen I. Laskin, S.S., y Geoffrey, M.G. (eds): Academic Press, pp. 257-295.
- Sonnleitner, E., y Haas, D. 2011. Small RNAs as regulators of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas* species. *Appl Microbiol Biotechnol* 91: 63-79.
- Sourjik, V., Sterr, W., Platzner, J., Bos, I., Haslbeck, M., y Schmitt, R. 1998. Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene* 223: 283-290.
- Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Pees, E., y Lugtenberg, B.J.J. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol* 9: 27-39.
- Stavri, M., Piddock, L.J., y Gibbons, S. 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother* 59: 1247-1260.
- Stoitsova, S.O., Braun, Y., Ullrich, M.S., y Weingart, H. 2008. Characterization of the RND-type multidrug efflux pump MexAB-OprM of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Appl Environ Microbiol* 74: 3387-3393.
- Studholme, D.J. 2011. Application of high-throughput genome sequencing to intrapathovar variation in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant Pathology* 12: 829-838.
- Su, C.-C., Rutherford, D.J., y Yu, E.W. 2007. Characterization of the multidrug efflux regulator AcrR from *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 361: 85-90.
- Sundin, G.W., y Murillo, J. 1999. Functional analysis of the *Pseudomonas syringae* *ruAB* determinant in tolerance to ultraviolet B (290–320 nm) radiation and distribution of *ruAB* among *P. syringae* pathovars. *Environ Microbiol* 1: 75-87.
- Suoniemi, A., Björklöf, K., Haahtela, K., y Romantschuk, M. 1995. Pili of *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae* enhance initiation of bacterial epiphytic colonization of bean. *Microbiology* 141: 497-503.

- Syed, K.A., Beyhan, S., Correa, N., Queen, J., Liu, J., Peng, F., Satchell, K.J., Yildiz, F., y Klose, K.E. 2009. The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. *J Bacteriol* 191: 6555-6570.
- Taguchi, F., Takeuchi, K., Katoh, E., Murata, K., Suzuki, T., Marutani, M., Kawasaki, T., Eguchi, M., Katoh, S., Kaku, H. *et al.* 2006. Identification of glycosylation genes and glycosylated amino acids of flagellin in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Cell Microbiol* 8: 923-938.
- Taguchi, F., Yamamoto, M., Ohnishi-Kameyama, M., Iwaki, M., Yoshida, M., Ishii, T., Konishi, T., y Ichinose, Y. 2010. Defects in flagellin glycosylation affect the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. *Microbiology* 156: 72-80.
- Taguchi, F., y Ichinose, Y. 2011. Role of type IV pili in virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605: correlation of motility, multidrug resistance, and HR-inducing activity on a nonhost plant. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 1001-1011.
- Tahara, S. 2007. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1387-1404.
- Taira, S., Tuimala, J., Roine, E., Nurmiho-Lassila, E.-L., Savilahti, H., y Romantschuk, M. 1999. Mutational analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* *hrpA* gene encoding Hrp pilus subunit. *Mol Microbiol* 34: 737-744.
- Takeuchi, K., Taguchi, F., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., y Ichinose, Y. 2003. Flagellin glycosylation island in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and its role in host specificity. *J Bacteriol* 185: 6658-6665.
- Tampakaki, A.P., Skandalis, N., Gazi, A.D., Bastaki, M.N., Sarris, P.F., Charova, S.N., Kokkinidis, M., y Panopoulos, N.J. 2010. Playing the "Harp": evolution of our understanding of *hrp/hrc* genes. *Annu Rev Phytopathol* 48: 347-370.
- Tang, X., Xiao, Y., y Zhou, J.-M. 2006. Regulation of the Type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 1159-1166.
- Tart, A.H., Wolfgang, M.C., y Wozniak, D.J. 2005. The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of *fleQ*. *J Bacteriol* 187: 7955-7962.
- Tart, A.H., Blanks, M.J., y Wozniak, D.J. 2006. The AlgT-dependent transcriptional regulator AmrZ (AlgZ) inhibits flagellum biosynthesis in mucoid, nonmotile *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *J Bacteriol* 188: 6483-6489.
- Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O., y Lewis, K. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3133-3141.
- Terán, W., Felipe, A., Segura, A., Rojas, A., Ramos, J.L., y Gallegos, M.T. 2003. Antibiotic-dependent induction of *Pseudomonas putida* DOT-T1E TtgABC efflux pump is mediated by the drug binding repressor TtgR. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3067-3072.
- Terán, W., Krell, T., Ramos, J.L., y Gallegos, M.T. 2006. Effector-repressor interactions, binding of a single effector molecule to the operator-bound TtgR homodimer mediates derepression. *J Biol Chem* 281: 7102-7109.
- Terashima, H., Kojima, S., y Homma, M. 2008. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int Rev Cell Mol Biol* 270: 39-85.
- Thomashow, L., y Weller, D. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In *Plant-Microbe Interactions*. Stacey, G., y Keen, N. (eds): Springer US, pp. 187-235.

- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., y Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882.
- Toutain, C.M., Zegans, M.E., y O'Toole, G.A. 2005. Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187: 771-777.
- Treutter, D. 2005. Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol* 7: 581-591.
- Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J., Park, D., Nies, D.H., Goffeau, A., y Saier, M.H., Jr. 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 107-125.
- Tsilibaris, V., Maenhaut-Michel, G., y Van Melderen, L. 2006. Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. *Res Microbiol* 157: 701-713.
- Tsuchiya, H., y Iinuma, M. 2000. Reduction of membrane fluidity by antibacterial sophoraflavanone G isolated from *Sophora exigua*. *Phytomedicine* 7: 161-165.
- Ullrich, M., Penalzoza-Vazquez, A., Bailey, A.M., y Bender, C.L. 1995. A modified two-component regulatory system is involved in temperature-dependent biosynthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine. *J Bacteriol* 177: 6160-6169.
- Valverde, C., Heeb, S., Keel, C., y Haas, D. 2003. RsmY, a small regulatory RNA, is required in concert with RsmZ for GacA-dependent expression of biocontrol traits in *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Microbiol* 50: 1361-1379.
- Valverde, C., y Haas, D. 2008. Small RNAs controlled by two-component systems. In *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*. Utsumi, R. (ed): Springer New York, pp. 54-79.
- Van Dyk, T.K., Templeton, L.J., Cantera, K.A., Sharpe, P.L., y Sariaslani, F.S. 2004. Characterization of the *Escherichia coli* AaeAB efflux pump: a metabolic relief valve? *J Bacteriol* 186: 7196-7204.
- van Veen, H.W., Higgins, C.F., y Konings, W.N. 2001. Molecular basis of multidrug transport by ATP-binding cassette transporters: a proposed two-cylinder engine model. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 185-192.
- Vandeputte, O.M., Kiendrebeogo, M., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., El Jaziri, M., y Baucher, M. 2010. Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of Quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* 76: 243-253.
- Vandeputte, O.M., Kiendrebeogo, M., Rasamiravaka, T., Stévigny, C., Duez, P., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., Baucher, M., y El Jaziri, M. 2011. The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 157: 2120-2132.
- VanEtten, H.D., Temporini, E., y Wasmann, C. 2001. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiol Mol Plant Pathol* 59: 83-93.
- Vargas, P., Felipe, A., Michán, C., y Gallegos, M.T. 2011. Induction of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 MexAB-OprM multidrug efflux pump by flavonoids is mediated by the repressor PmeR. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 1207-1219.
- Veit, M., y Pauli, G.F. 1999. Major flavonoids from *Arabidopsis thaliana* leaves. *J Nat Prod* 62: 1301-1303.
- Ventre, I., Goodman, A.L., Vallet-Gely, I., Vasseur, P., Soscia, C., Molin, S., Bleves, S., Lazdunski, A., Lory, S., y Filloux, A. 2006. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 171-176.

- Venturi, V. 2003. Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: why so different? *Mol Microbiol* 49: 1-9.
- Vikram, A., Jayaprakasha, G.K., Jesudhasan, P.R., Pillai, S.D., y Patil, B.S. 2010. Suppression of bacterial cell–cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *J Appl Microbiol* 109: 515-527.
- Vikram, A., Jesudhasan, P.R., Jayaprakasha, G.K., Pillai, S.D., Jayaraman, A., y Patil, B.S. 2011. Citrus flavonoid represses *Salmonella* pathogenicity island 1 and motility in *S. Typhimurium* LT2. *Int J Food Microbiol* 145: 28-36.
- Vodovar, N., Vallenet, D., Cruveiller, S., Rouy, Z., Barbe, V., Acosta, C., Cattolico, L., Jubin, C., Lajus, A., Segurens, B. *et al.* 2006. Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*. *Nat Biotech* 24: 673-679.
- Vorholt, J.A. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nat Rev Micro* 10: 828-840.
- Walsh, C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406: 775-781.
- Wang, N., Lu, S.-E., Wang, J., Chen, Z.J., y Gross, D.C. 2006. The expression of genes encoding lipodepsipeptide phytotoxins by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is coordinated in response to plant signal molecules. *Mol Plant Microbe Interact* 19: 257-269.
- Wäspi, U., Blanc, D., Winkler, T., Rüedi, P., y Dudler, R. 1998. Syringolin, a novel peptide elicitor from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* that induces resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 727-733.
- Watt, T.F., Vucur, M., Baumgarth, B., Watt, S.A., y Niehaus, K. 2009. Low molecular weight plant extract induces metabolic changes and the secretion of extracellular enzymes, but has a negative effect on the expression of the type-III secretion system in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *J Biotechnol* 140: 59-67.
- Webber, M.A., Bailey, A.M., Blair, J.M.A., Morgan, E., Stevens, M.P., Hinton, J.C.D., Ivens, A., Wain, J., y Piddock, L.J.V. 2009. The global consequence of disruption of the AcrAB-TolC efflux pump in *Salmonella enterica* includes reduced expression of SPI-1 and other attributes required to infect the host. *J Bacteriol* 191: 4276-4285.
- Wei, C.F., Deng, W.L., y Huang, H.C. 2005. A chaperone-like HrpG protein acts as a suppressor of HrpV in regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* type III secretion system. *Mol Microbiol* 57: 520-536.
- Wei, C.F., Kvitko, B.H., Shimizu, R., Crabill, E., Alfano, J.R., Lin, N.C., Martin, G.B., Huang, H.C., y Collmer, A. 2007. A *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* 51: 32-46.
- Wei, W., Plovanich-Jones, A., Deng, W.L., Jin, Q.L., Collmer, A., Huang, H.C., y He, S.Y. 2000. The gene coding for the Hrp pilus structural protein is required for type III secretion of Hrp and Avr proteins in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2247-2252.
- Wilson, M., y Lindow, S.E. 1993. Interactions between the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* A506 and *Erwinia amylovora* in pear blossoms. *Phytopathology* 83: 117-123.
- Willis, D.K., Hrabak, E.M., Rich, J.J., Barta, T.M., Lindow, S.A., y Panopoulos, N.J. 1990. Isolation and characterization of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* mutant deficient in lesion formation on bean. *Mol Plant Microbe Interact* 3: 149-156.

- Willis, D.K., Holmstadt, J.J., y Kinscherf, T.G.** 2001. Genetic evidence that loss of virulence associated with *gacS* or *gacA* mutations in *Pseudomonas syringae* B728a does not result from effects on alginate production. *Appl Environ Microbiol* 67: 1400-1403.
- Workentine, M.L., Chang, L., Ceri, H., y Turner, R.J.** 2009. The GacS-GacA two-component regulatory system of *Pseudomonas fluorescens*: a bacterial two-hybrid analysis. *FEMS Microbiol Lett* 292: 50-56.
- Wu, D., Kong, Y., Han, C., Chen, J., Hu, L., Jiang, H., y Shen, X.** 2008. D-Alanine:D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. *Int J Antimicrob Agents* 32: 421-426.
- Wu, J., y Newton, A.** 1997. Regulation of the *Caulobacter* flagellar gene hierarchy; not just for motility. *Mol Microbiol* 24: 233-239.
- Xiao, Y., Lu, Y., Heu, S., y Hutcheson, S.W.** 1992. Organization and environmental regulation of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 *hrp* cluster. *J Bacteriol* 174: 1734-1741.
- Xiao, Y., Heu, S., Yi, J., Lu, Y., y Hutcheson, S.W.** 1994. Identification of a putative alternate sigma factor and characterization of a multicomponent regulatory cascade controlling the expression of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* Pss61 *hrp* and *hrmA* genes. *J Bacteriol* 176: 1025-1036.
- Xiao, Y., y Hutcheson, S.W.** 1994. A single promoter sequence recognized by a newly identified alternate sigma factor directs expression of pathogenicity and host range determinants in *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* 176: 3089-3091.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., y Messing, J.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Yu, J., Peñaloza-Vázquez, A., Chakrabarty, A.M., y Bender, C.L.** 1999. Involvement of the exopolysaccharide alginate in the virulence and epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Mol Microbiol* 33: 712-720.
- Yu, Z., Reichheld, S.E., Savchenko, A., Parkinson, J., y Davidson, A.R.** 2010. A comprehensive analysis of structural and sequence conservation in the TetR family transcriptional regulators. *J Mol Biol* 400: 847-864.
- Zhang, Y.M., y Rock, C.O.** 2004. Evaluation of epigallocatechin gallate and related plant polyphenols as inhibitors of the FabG and FabI reductases of bacterial type II fatty-acid synthase. *J Biol Chem* 279: 30994-31001.
- Zheleznova, E.E., Markham, P., Edgar, R., Bibi, E., Neyfakh, A.A., y Brennan, R.G.** 2000. A structure-based mechanism for drug binding by multidrug transporters. *Trends Biochem Sci* 25: 39-43.
- Zhou, H., Lin, J., Johnson, A., Morgan, Robyn L., Zhong, W., y Ma, W.** 2011. *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1 targets a host enzyme to suppress isoflavone biosynthesis and promote infection in soybean. *Cell Host Microbe* 9: 177-186.
- Zuber, S., Carruthers, F., Keel, C., Mattart, A., Blumer, C., Pessi, G., Gigot-Bonnefoy, C., Schnider-Keel, U., Heeb, S., Reimann, C. et al.** 2003. GacS sensor domains pertinent to the regulation of exoproduct formation and to the biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 634-644.
- Zwiesler-Vollick, J., Plovanich-Jones, A.E., Nomura, K., Bandyopadhyay, S., Joardar, V., Kunkel, B.N., y He, S.Y.** 2002. Identification of novel *hrp*-regulated genes through functional genomic analysis of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 genome. *Mol Microbiol* 45: 1207-1218.

APÉNDICE

Apéndice 1.

Tabla 17. Concentración de los compuestos utilizados en este trabajo. Se muestran las equivalencias en µg/ml y mM.

Compuesto	µg/ml	mM
Antibióticos		
Ampicilina	3	0,008
	371,4	1
Cloranfenicol	0,2	0,00062
	0,3	0,00093
	0,5	0,00155
	323,13	1
Tetraciclina	444,3	1
Biocidas		
Butilparabeno	38,84	0,2
	97,10	0,5
	194,2	1
Metilparabeno	60,84	0,4
	152,1	1
Flavonoides		
(+)-catequina	290,3	1
Floreтина	13,71	0,05
	41,14	0,15
	54,85	0,2
	82,28	0,3
	137,14	0,5
	274,27	1
Floridzina	472,44	1
Morina	90,67	0,3
	105,78	0,35
	302,24	1
Naringenina	74,45	0,2
	111,68	0,3
	372,25	1
Quercetina	338,26	1

Apéndice 2.

Publicación: Vargas, P., Felipe, A., Michán, C., y Gallegos, M.T. 2011. Induction of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 MexAB-OprM multidrug efflux pump by flavonoids is mediated by the repressor PmeR. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 1207-1219.

Induction of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 MexAB-OprM Multidrug Efflux Pump by Flavonoids Is Mediated by the Repressor PmeR

Paola Vargas,¹ Antonia Felipe,¹ Carmen Michán,² and María-Trinidad Gallegos¹

¹Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC), Granada, Spain;

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Cordoba, Spain

Submitted 29 March 2011. Accepted 27 May 2011.

In this study, we have analyzed the expression of the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *mexAB-oprM* efflux pump operon and of the regulatory gene *pmeR*, and we have investigated the role of the PmeR protein on transcription from both promoters. We demonstrate that *mexAB-oprM* and *pmeR* are expressed *in vivo* at a relatively high and moderate basal level, respectively, which, in both cases, increases in the presence of different flavonoids and other compounds, such as butyl and methylparaben. We show that PmeR is the local repressor of the *mexAB-oprM* promoter and is able to regulate its own expression. The mechanism for this regulation includes binding to a pseudopalindromic operator site which overlaps both *mexAB-oprM* and *pmeR* promoters. We have also proven that flavonoids are able to interact with PmeR and induce a conformational change that interferes with the DNA binding ability of PmeR, thereby modulating *mexAB-oprM* and *pmeR* expression. Finally, we demonstrate by *in vivo* experiments that the PmeR/MexAB-OprM system contributes to the colonization of tomato plants. These results provide new insight into a transcriptional regulator and a transport system that play essential roles in the ability of *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 to resist the action of flavonoids produced by the host.

Microorganisms are continuously exposed to naturally occurring deleterious chemicals, such as natural antibiotics produced by members of microbial communities, fungi, and plants or detergents such as bile salts present in the intestinal tract of higher animals. Apart from these toxins, human activity also has led to the production of a great diversity of noxious organic and inorganic chemicals (xenobiotics) and, furthermore, semi-synthetic antibiotics or biocides have been specifically developed to act as antimicrobial agents. These toxic compounds usually affect the structure of biological membranes or impair biosynthetic pathways essential for microbial growth. Nevertheless, bacteria display resistance to their action due to intrinsic long-standing mechanisms that protect the cells. Among the mechanisms underlying the resistance to toxic chemicals, active exclusion catalyzed by efflux pumps is widespread. Efflux pumps either can be specific for one substrate or can

transport a range of structurally dissimilar compounds, including antibiotics of different chemical classes, biocides, dyes, detergents, metabolic inhibitors, and organic solvents (Li and Nikaido 2009). The pumps that transport several compounds are associated with multidrug resistance (MDR) and have clinical relevance because they can render bacterial infections untreatable by the agents of choice.

Plants produce a vast array of natural products, many of which have evolved to confer selective advantage against microbial attack. Flavonoids, isoprenoids, and alkaloids compose three major classes of secondary metabolites synthesized by higher plants that have been considered important for protection against pathogens. They may be preformed compounds present in healthy plant tissue or may be synthesized *de novo* in response to pathogen attack (Dixon 2001; Osbourn 1996). Therefore, successful pathogens must be able to circumvent the toxic effects of these plant antimicrobials (Van Etten et al. 2001) and, for that, they have MDR efflux pumps belonging to the same families as those present in bacteria that infect humans and animals.

Five families of bacterial efflux pump associated with MDR have been reported: the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, the major facilitator superfamily (MFS), the multidrug and toxic-compound extrusion (MATE) family, the small multidrug resistance (SMR) family, and the resistance-nodulation-cell division (RND) family (Saier and Paulsen 2001). Efflux pumps of the RND family expressed by gram-negative bacteria are organized as tripartite systems: a transporter protein located in the cytoplasmic membrane (acting as an energy-dependent extrusion pump) is attached through a membrane fusion protein to an outer membrane protein. The latter is a channel which circumvents the outer membrane, allowing the discharge of the toxic compound into the external medium (Eswaran et al. 2004; Murakami et al. 2006; Poole 2003). Thus, efflux through RND pumps is driven by the proton motive force and allows the removal of toxic compounds across the inner and outer membranes of the cell envelope bypassing the periplasm.

Most RND efflux pumps are under transcriptional or translational control to maintain low levels of expression, because overexpression of integral membrane proteins coupled to the proton-motive force has deleterious effects (Hillen and Berens 1994; Johanesen et al. 2001, Ma et al. 1996). Thus, the expression of most genes encoding efflux pumps is controlled by transcriptional regulators (sometimes activators but predominantly repressors), whose genes are often located adjacent to them. Nevertheless, in addition to this specific or local regulation, the expression of some pumps is under an additional level of control by various global regulators (Li and Nikaido 2009).

Corresponding author: M.-T. Gallegos; Telephone: +34 958 181600 ext. 133; Fax: +34 958 129600; E-mail: maritri.gallegos@eez.csic.es

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that Figure 8 appears in color online.

The broad substrate specificity exhibited by the transporter contrasts with the limited chemical specificity shown by the vast majority of ligand binding proteins. However, the phenomenon of multidrug recognition is not exclusively confined to multidrug transporters, because several transcriptional regulators promote transporter expression in response to structurally dissimilar toxic compounds. The peculiarity of these systems is that the regulators controlling the expression of the transporters respond to the same range of compounds that the transporter extrudes (Grkovic et al. 1998; Lomovskaya et al. 1995; Ma et al. 1996; Terán et al. 2003, 2006).

Several RND transporters have been characterized in phytopathogenic bacteria and their physiological function or role in virulence determined. *Agrobacterium tumefaciens* IfeAB is involved in the competitive colonization of alfalfa roots by reducing cellular accumulation of isoflavonoids (Palumbo et al. 1998). *Erwinia chrysanthemi* possesses two AcrAB systems, which are involved in the resistance to the plant antimicrobial peptide thionin and play an essential role in colonization of chicory leaves (Maggiarani-Valecillos et al. 2006). Also in *E. chrysanthemi*, it has been shown that the inactivation of TolC has a dramatic effect on pathogenesis (Barabote et al. 2003). TolC is the outer membrane component of several MDR efflux pumps in the RND family; thus, this mutation probably affects the function of a large number of transporters at the same time. It was demonstrated that the RND-type AcrAB efflux system plays an important role in virulence of *E. amylovora*, the causal agent of fire blight in various members of the family *Rosaceae*, because it is required for resistance to antimicrobial plant metabolites and for successful colonization of the host plant (Burse et al. 2004). Moreover, two transporters belonging to the RND family have been involved in secretion of phytotoxins: *Burkholderia glumae* BGR1 produces a broad-host-range phytotoxin, called toxoflavin, which is transported by ToxGHI (Kim et al. 2004); and the PseABC system was identified in the *syr-syp* genomic island of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* required for biosynthesis of syringomycin and syringopeptin. Disruption of the *pseC* gene resulted in substan-

tial reduction of phytotoxin secretion and virulence (Kang and Gross 2005).

On the other hand, the importance of plant signals for the regulation of different virulence factors has been well established (Cornelis and van Gijsegem 2000). However, the regulatory circuits acting on the expression of RND transporters in response to plant-produced compounds constitute an unexplored field. In *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448A, *P. syringae* pv. *syringae* B728a, and *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, whose host ranges are different (1448A and B728a cause disease in bean, and DC3000 is pathogenic for tomato and *Arabidopsis*), the RND transporter MexAB-OprM (PSPTO_4303-4304-4305) was shown to be involved in tolerance to a broad range of compounds (antibiotics, plant-derived antimicrobials, detergents, and dyes) and in the ability to multiply in planta (Stoitsova et al. 2008). A gene encoding a transcriptional regulator, *pmeR* (PSPTO_4302), was identified upstream of the *mexAB-oprM* structural genes (Stoitsova et al. 2008). Its deduced amino acid sequence exhibited a high degree of identity to members of the TetR family of transcriptional repressors, including proteins of different *P. syringae* pathovars (90 to 95% identity), regulators of *P. fluorescens* (68-74% identity), such as EmhR (Hearn et al. 2003); *P. putida* (66 to 67% identity), such as TtgR (Terán et al. 2003); and *Erwinia* spp. (42 to 44% identity), such as AcrR of *E. amylovora* (Burse et al. 2004), among others. However, no significant similarity was found to MexR, a member of the MarR family of bacterial transcriptional regulators, which negatively regulates the *mexAB-oprM* operon in *P. aeruginosa* (Poole et al. 1996). The homology of the *pmeR* gene product with previously described repressor proteins and its proximity to the efflux pump operon suggested that PmeR regulates *mexAB-oprM* expression and probably its own expression, as is the case for other regulators of the TetR family (Aramaki et al. 1995; Guilfoile and Hutchinson 1992; Hillen and Berens 1994; Terán et al. 2003).

The aim of this study was to analyze the role of the PmeR protein in the expression of the *mexAB-oprM* efflux pump operon and its own gene, *pmeR*. Also, we intended to deter-

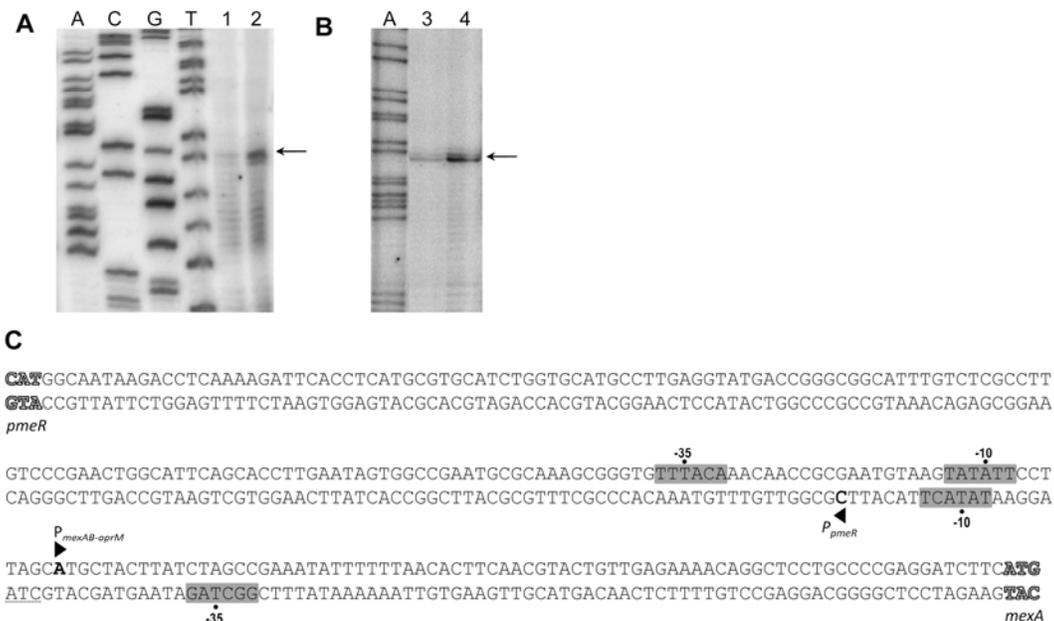


Fig. 1. Determination of the transcription start sites of **A**, the *mexAB-oprM* operon and **B**, the *pmeR* gene by primer extension analysis. Total RNAs of wild type (lanes 1 and 3) and DC3000R (lanes 2 and 4) cells grown in Luria-Bertani medium were prepared and used for the reverse transcription reactions to generate the runoff cDNAs. Lanes A, C, G, and T contain the products of the dideoxy sequencing reactions with the same primers as those used for the respective reverse transcriptions. Runoff cDNAs are indicated by arrows. **C**, Nucleotide sequence of the *pmeR-mexA* intergenic region. The -10 and -35 positions of P_{pmeR} and P_{mexA} are indicated by a dot, the +1 and the direction of transcription are marked with an arrowhead, and the initiation codons are also marked.

mine the natural ligands of the regulatory protein PmeR and the regulatory network involved in the expression of the efflux pump, in order to elucidate the role of the PmeR/MexAB-OprM system in plant pathogenesis.

RESULTS

Localization of the promoter elements and transcription start points for *mexAB-oprM* and *pmeR*.

Previous inspection of the sequence upstream of *mexAB-oprM* had revealed a divergently transcribed open reading frame (ORF), *pmeR*, postulated to regulate *mexAB-oprM* transcription. To determine the role of PmeR as transcriptional regulator in *P. syringae* pv. *tomato*, we constructed a *pmeR*-null mutant by marker exchange mutagenesis using the suicide plasmid pPVG-R Ω Km. Polymerase chain reaction (PCR) and Southern blot were used to confirm integration of the Ω Km interposon in the genomic *pmeR* locus (not shown).

To localize the actual promoter or promoters used by *mexAB-oprM* and *pmeR*, the transcription start point for both operons was determined in the wild type and DC3000R (*pmeR* disruptant) using primer extension analysis. Regardless of the

growth conditions (not shown), the *mexAB-oprM* operon was transcribed from a single promoter (Fig. 1A), because only a specific band containing runoff cDNA corresponding to *mexAB-oprM* was detected. We identified the transcription initiation site of *mexA* at the A located 79 bp upstream of its first ATG. We predicted that the -10 and -35 sequences of the *mexAB-oprM* promoter are TATATT and TTTACA, respectively, with an 18-bp spacer (Fig. 1C), which are similar to promoter sequences recognized by the σ^{70} -RNA polymerase (Lisser and Margalit 1993). For *pmeR*, one specific band of runoff cDNA was detected on the RNA samples from the wild-type and DC3000R strains but the intensity of this band in the wild-type strain seemed to be substantially less than in the null mutant (Fig. 1B). This suggests that the *pmeR* gene is autorepressed, as is the case for other negative regulatory genes such as *tetR* (Hillen and Berens 1994). Thus, we determined the transcription start site of *pmeR* at G -154 with respect to its first ATG and predicted that the -35 and -10 sequences of the *pmeR* promoter are GGCTAG and TATACT with a 20-bp spacer (Fig. 1C), which also correspond to a σ^{70} -RNA polymerase promoter. The location of the start sites indicates that the promoters of the divergently transcribed *pmeR* and *mexA* overlap and are both under the control of the same regulator, probably PmeR.

Substrates of MexAB-OprM act as inducers of *mexAB-oprM* and *pmeR* expression.

To study whether the compounds identified as substrates of the efflux pump (Stoitsova et al. 2008) also influenced in vivo gene expression of the *mexAB-oprM* efflux pump operon and the *pmeR* gene, we constructed two sets of plasmids (pPV1A and pPV2R) in which the same *pmeR-mexA* intergenic region fragment was cloned in both directions, producing fusions of the *mexA* and the *pmeR* promoters, respectively, to *lacZ*. These plasmids were introduced into the wild-type strain and β -galactosidase (β -gal) activity was determined in the absence and in the presence of various MexAB-OprM substrates: butylparaben, (+)-catechin, genistein, indole, luteolin, methylparaben, naringenin, phloridzin, and phloretin (Fig. 2A and B). The β -gal activity of $P_{mexAB-oprM}$ increased significantly in the presence of phloretin, methyl paraben, and naringenin, with phloretin being the most effective inducer. Addition of indole and butyl paraben resulted in moderate induction of the β -gal activity, whereas addition of genistein and luteolin induced β -gal activity only very slightly, and addition of other antibiotics (ampicillin, carbenicillin, chloramphenicol, or kanamycin) did not induce β -gal activity at all (Fig. 2). P_{pmeR} exhibited lower overall levels of expression than those of $P_{mexAB-oprM}$ but a similar pattern of expression and induction (Fig. 2). This suggests a common mechanism of regulation for both promoters, also consistent with the fact that both promoters fully overlap.

The *pmeR* gene encodes a repressor of *mexAB-oprM* and *pmeR* expression.

The homology of the *pmeR* gene product with repressor proteins of the TetR family of transcriptional regulators, together with its proximity to the efflux pump operon as well as the results presented above, suggest that PmeR acts locally, repressing *mexAB-oprM* and probably its own expression, as is the case for other transcriptional regulators of the TetR family (Hernández et al. 2009; Hillen and Berens 1994; Hirooka et al. 2007). To confirm this hypothesis, strains DC3000 (wild type), DC3000A (*mexA:: Ω Km*), and DC3000R (*pmeR:: Ω Km*) were used to assess *mexAB-oprM* and *pmeR* expression by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the absence and in the presence of phloretin, the compound

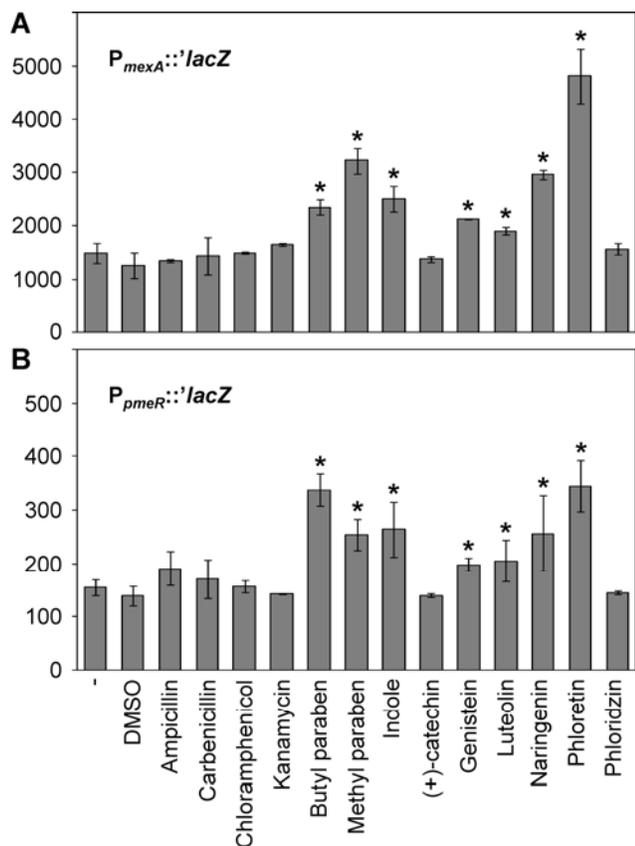


Fig. 2. Expression of *mexAB-oprM* and *pmeR* promoters in the presence of different antimicrobial compounds. The β -galactosidase activity from **A**, the *mexAB-oprM* (pPV1A) and **B**, *pmeR* (pPV2R) promoters was determined in DC3000 cultures grown to an optical density at 660 nm of 2 in the absence (-) or in the presence of different chemicals at sublethal concentrations: ampicillin (3 μ g/ml), butylparaben (0.5 mM), carbenicillin (40 μ g/ml), (+)-catechin (1 mM), chloramphenicol (2 μ g/ml), genistein (0.5 mM), indole (0.3 mM), kanamycin (0.1 μ g/ml), luteolin (0.5 mM), methylparaben (0.4 mM), naringenin (1 mM), phloretin (0.4 mM), and phloridzin (1 mM). Compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide when needed. Results shown are the mean of three different experiments with their respective standard deviations; * indicates that increases of β -galactosidase activity are significant with respect to the noninduced condition as determined by one-way analysis of variance ($P < 0.05$).

inducing the highest expression from both promoters (Fig. 2). We observed that, in the wild type, both operons were induced 3.6- and 2.5-fold, respectively, by phloretin but not in response to any of the antibiotics tested (i.e., carbenicillin, chloramphenicol, nalidixic acid, tetracycline, or gentamicin) (not shown). In the DC3000A mutant, the *pmeR* promoter behaved similarly to the wild type; however, in the DC3000R mutant, the levels of the *mexA* transcripts were 3.6-fold higher than in its parental strain, and a slight 1.3-fold increase in transcription was detected in the presence of phloretin (Fig. 3). This suggests that there may be an additional transcriptional regulator, probably an activator, which induces expression of *mexA* in the presence of phloretin. Given the nature of the mutation (the insertion of an interposon with transcriptional and translational terminators), the analysis of *mexA* and *pmeR* RNAs in DC3000A and DC3000R, respectively, was not possible.

To further confirm the effect of PmeR over both promoters, β -gal assays were carried out in the wild-type and mutant strains throughout the growth curve in the absence and in the presence of phloretin (Fig. 4). In the wild-type strain, the basal activity of both promoters (in the absence of phloretin) remained substantially constant throughout the growth curve (Fig. 4A). In the presence of phloretin, expression from both promoters increased with respect to the basal level, up to 2.5-fold in the case of $P_{mexAB-oprM}$ and 1.7-fold in the case of P_{pmeR} . However, expression from $P_{mexAB-oprM}$ was significantly higher than that of P_{pmeR} in both the absence and presence of phloretin (Fig. 4A).

It was observed that inactivation of PmeR in DC3000R caused an increase of approximately threefold on the basal expression of $P_{mexAB-oprM}$ compared with the activity in the wild-type strain (Fig. 4B), indicating that PmeR acts as a repressor of the efflux pump promoter. In the *pmeR* mutant, $P_{mexAB-oprM}$ expressed at almost the same level in both the presence and absence of the inducer phloretin (Fig. 4B). The activity of P_{pmeR} in the *pmeR*-null strain also increased overall with respect to that achieved in the presence of the repressor (Fig. 4A and B) and was independent of the presence of phloretin. Also, a change in P_{pmeR} expression along the growth curve in DC3000R was observed because it gradually increased as the cultures approached the stationary growth phase (Fig. 4B and D). We considered the possibility that P_{pmeR} expression was RpoS dependent. However, no significant differences were observed in the expression of P_{pmeR} along the growth curve in an *rpoS* mutant compared with the wild type (not shown), suggesting that P_{pmeR} is not dependent on this σ factor. We also studied the behavior of the $P_{mexAB-oprM}$ and P_{pmeR} in DC3000A, a mutant lacking the efflux pump. We observed that the deletion

of the efflux pump caused an increase of approximately two-fold on the basal expression of $P_{mexAB-oprM}$ compared with the activity in the wild-type strain, which persisted in the presence of phloretin, although more subtly (Fig. 4C). The same behavior was also observed in the expression of the *pmeR* promoter (Fig. 4C). The absence of the pump may account for the increased basal level of expression of both $P_{mexAB-oprM}$ and P_{pmeR} in the DC3000A mutant, because accumulation of an unknown efflux pump substrate could act as inducer. Also, the increased level of expression of both $P_{mexAB-oprM}$ and P_{pmeR} in the *mexAB-oprM* mutant in the presence of phloretin may be attributed to the accumulation of this compound within the cell due to the lack of the MexAB-OprM efflux pump.

In summary, the expression of both promoters in the strain DC3000R was found to be higher than that of the wild-type strain and similar to that observed in the presence of inducers as phloretin. These results further corroborate that PmeR represses not only the *mexAB-oprM* promoter activity but also its own expression.

The overexpression of the efflux pump in the *pmeR*-null mutant should cause a distinct phenotype (e.g., on its resistance to antimicrobial compounds). To confirm this hypothesis, we examined the susceptibility of the DC3000R mutant to several chemicals in comparison with the wild-type and DC3000A strains. For that, we determined the minimal inhibitory concentration (MIC) of different plant antimicrobial molecules, antibiotics, and biocides (Table 1). We observed that the *pmeR*-null mutant was more resistant than the wild type to several antibiotics such as ampicillin, carbenicillin, chloramphenicol, nalidixic acid, or tetracycline, whereas the DC3000A mutant was more sensitive than the wild type to those compounds, as had been previously shown (Stoitsova et al. 2008). Due to the low solubility of flavonoids in water, it was not possible to distinguish between the MIC of the wild type and the DC3000R mutant. Instead, we carried out antibiosis plate assays and determined the halo of growth inhibition caused by each compound. As a control, dimethyl sulfoxide (DMSO) was used in order to verify that the zone of inhibition was due to the flavonoid and not to the solvent, because DMSO had no effect on the growth of any of the strains. With this test, we observed that the strain deficient in the MexAB-OprM pump exhibited growth inhibition halos around (+)-catechin (2.3 cm), phloridzin (1.97 cm), and phloretin (1.45 cm) that were approximately twofold wider than those obtained with the wild type (0.9, 1, and 0.75 cm, respectively), suggesting that these flavonoids are substrates of the pump (Fig. 5). On the other hand, the mutant lacking the regulatory protein PmeR was more resistant than the wild type to (+)-catechin, and phloretin, with which

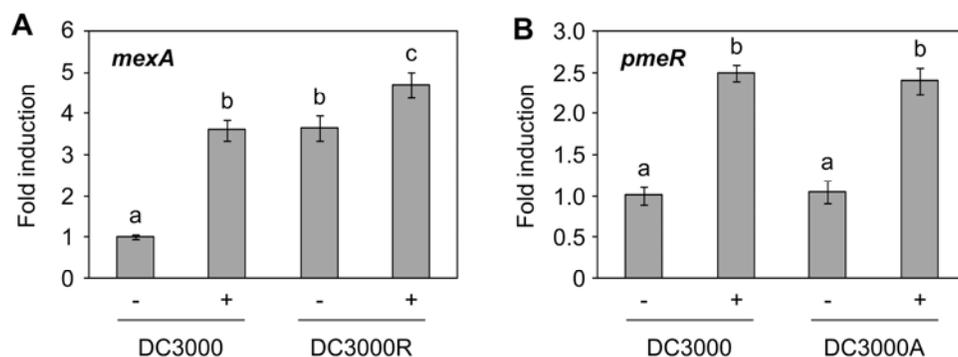


Fig. 3. Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) of *mexAB-oprM* and *pmeR* RNA in different *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strains. DC3000, DC3000A, and DC3000R strains were grown in Luria-Bertani medium in the absence and in the presence of 0.3 mM phloretin (0.05 mM for the DC3000A mutant). Samples were collected at an optical density at 660 nm of 1.5, and total RNA was isolated and used to synthesized cDNA for RT-qPCR. Results shown are the means and standard deviations of three experiments with three replicates; a, b, and c denote analysis of variance categories for significant differences where $P < 0.05$.

no growth inhibition halos were observed (Fig. 5). This slight but reproducible increase in resistance to several antibiotics and other antimicrobial compounds that was observed in the *pmeR*-null mutant (Fig. 5; Table 1) is probably caused by the

increased expression of the transporter due to its total derepression after the deletion of the repressor, and is in accordance with the higher basal level of $P_{mexAB-oprM}$ expression observed in the mutant (Fig. 4B).

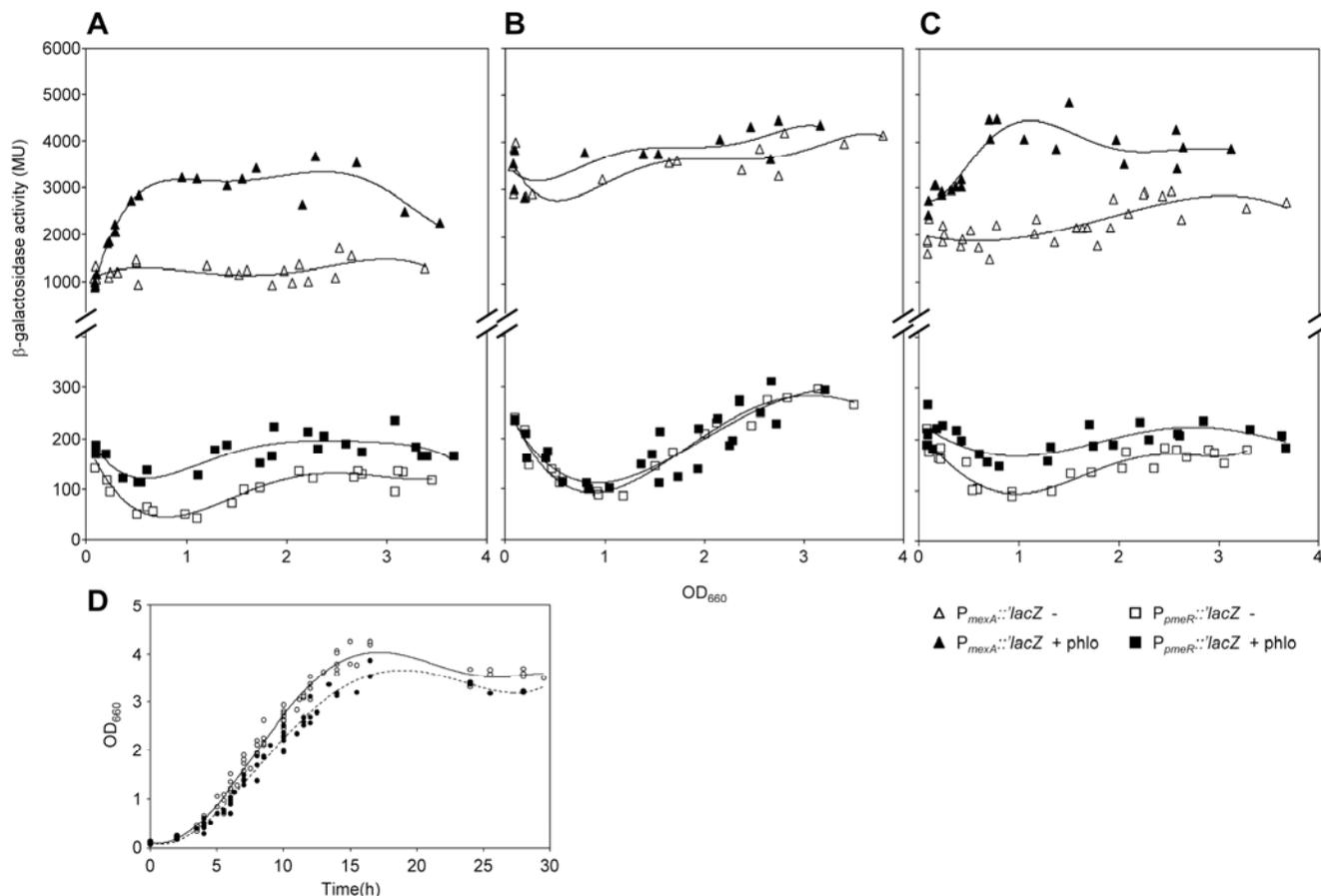


Fig. 4. Expression of *mexAB-oprM* and *pmeR* promoters in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, DC3000A, and DC3000R. β -Galactosidase activity from the *mexAB-oprM* (triangles) and *pmeR* (squares) promoters were determined in cultures grown in the absence (open symbols) or in the presence (filled symbols) of 0.3 mM phloretin (0.05 mM for the DC3000A mutant). **A**, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000; **B**, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000R; **C**, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000A; **D**, growth curve of DC3000 in the absence (open symbols) or in the presence (filled symbols) of 0.3 mM phloretin. Other strains exhibited similar curves.

Table 1. Susceptibility of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and mutants to different antimicrobial agents

Compound	Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)			
	DC3000	DC3000A	DC3000R	DC3000R (pPV4R) ^a
Ampicillin	62	0.39	156	ND
Butylparaben	759	379	1517	759
Carbenicillin	128	0.5	512	ND
(+)-Catechin	>9,072	1,814	>9,072	>9,072
Cefotaxime	7.8	0.08	62.5	7.8
Chloramphenicol	3.1	0.39	12.5	3.1
Ethidium bromide	78	20	156	78
Gentamicin	0.5	0.5	0.5	0.5
Hesperetin	>18,894	>18,894	>18,894	>18,894
Methylparaben	594	297	1,188	594
Morin	>9,447	471	>9,447	>9,447
Nalidixic acid	8	0.25	32	8
Naringenin	>11,633	582	>11,633	11,633
Norfloxacine	0.098	0.031	0.488	0.098
Phloretin	8,571	857	>8,572	4,286
Phloridzin	29,528	3,691	>29,528	7,382
Piperacillin	1.56	0.039	3.12	ND
Quercetin	>16,913	>16,913	>16,913	>16,913
Streptomycin	1.50	1.50	1.50	1.50
Tetracycline	0.50	0.05	2.00	ND
Triclosan	0.98	0.98	0.98	0.98

^a ND = not determined. The plasmid used to complement carries resistance genes to those antibiotics.

Heterologous complementation of the *pmeR* null mutant in trans with plasmid pPV4R, which carried the *pmeR* ORF from *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, restored sensitivity to all antimicrobials tested (Table 1). This suggested that the regulator and the efflux pump have similar effector and substrate profiles, respectively. The level of resistance of the *pmeR* trans-complemented mutant was lower than that of the wild-type strain because it was more susceptible to phloridzin, phloretin, and naringenin, suggesting that there was a gene copy effect due to the presence of *pmeR* on a plasmid.

Previous results showed that deletion of MexAB-OprM resulted in increased susceptibility of *P. syringae* pv. *tomato* to several β -lactamic antibiotics (ampicillin, carbenicillin, and piperacillin) and some plant-produced antimicrobials (berberine, naringenin, and phloretin) (Stoitsova et al. 2008). Using the *pmeR*-deficient strain, we have defined new substrate specificities of the MexAB-OprM efflux pump after observing that resistance to several flavonoids was compromised in a strain lacking *mexAB-oprM* and increased in the *pmeR*-deficient strain (Fig. 5; Table 1). Therefore, butylparaben, (+)-catechin, cefotaxime, methylparaben, morin, and phloridzin seem to be substrates for the *P. syringae* pv. *tomato* MexAB-OprM transporter, which indicates that the MexAB-OprM pump removes antimicrobial compounds of very different natures and

chemical structures, conferring intrinsic resistance toward a broad range of antibiotics and other anti-bacterial agents of plant origin.

PmeR acts a repressor of *mexAB-oprM* and *pmeR* expression by binding to their intergenic region.

To prepare the PmeR protein for in vitro experiments, the *pmeR* gene was cloned in the vector pET-29a(+), and native PmeR was overproduced in *Escherichia coli* BL21(DE3) cells by means of isopropyl- β -D-thiogalactoside addition. Purification of PmeR almost to homogeneity was achieved by heparin affinity column chromatography followed by gel filtration column chromatography, as described below. On a sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gel, a single 25.5-kDa protein was visualized (data not shown). As determined by gel filtration, the PmeR protein had a molecular mass of 54.4 kDa (data not shown), indicating that PmeR is a dimer in solution.

DNase I footprinting analysis was performed to identify the PmeR binding site at the *mexA* and *pmeR* promoter regions. When the PmeR protein was mixed with the probe (a 263-bp fragment bearing the *pmeR-mexA* intergenic region, bases -169 to +74, referred to the P_{mexA}), PmeR protected a region of 28 bp against DNase I, from -38 to -11 at the *mexA* promoter and from -11 to +17 at its own promoter and transcription initiation site because both promoters partially overlap (Fig. 6A, lanes 2 and 4). This unique position of the PmeR binding site with respect both divergent promoter regions is consistent with the coregulation of these promoters observed in vivo.

The G nucleotides critical for PmeR binding to its operator were identified by dimethylsulfate (DMS) footprinting assays (Fig. 6B). In the top (*mexA*) strand, G -18 and -22 were protected by PmeR binding, whereas A -10 was hypermethylated. In the bottom (*pmeR*) strand, a greater number of nucleotides were important for DNA binding: G -12, +8, +5, and +4; also, in this strand, A 18 was hypermethylated. The hypermethylation of As -10 and +18 may indicate that the DNA is distorted after PmeR binding. Our data support a model in which PmeR binds to its operator as two dimers and that union protects a region of 28 bp containing two pseudopalindromic sequences (Fig. 6C). Probably, the union of the first PmeR homodimer to the operator region facilitates the binding of the second dimer. The overall structure of this DNA region, with two pseudopalindromic sequences, is similar to that of those members of the TetR family that bind DNA with a 4:1 stoichiometry (Schumacher et al. 2002).

Structurally diverse substrates of MexAB-OprM inhibit binding of PmeR to its operator DNA.

To quantitatively evaluate the PmeR binding to its operator site, we performed gel retardation assays using the PmeR protein and the same probe that was used for DNase I footprinting (Fig. 7). PmeR bound to the probe containing its binding site, which resulted in retarded bands on a PAGE gel depending on the PmeR concentration. The apparent dissociation constant of PmeR for its operator was estimated to be 7 nM (Fig. 7A). It should be noted that only excess unlabeled intergenic competitor DNA and not excess control unspecific DNA was able to partially titrate out PmeR from its target DNA in gel mobility shift-binding reactions (not shown).

According to the footprint results, PmeR coordinately represses the expression of the efflux pump operon and its own expression by binding to an operator site which overlaps both promoters. From the in vivo experiments, we knew that *mexAB-oprM* and *pmeR* basal levels of expression exhibited a 3- and 1.5-fold increase, respectively, in a *pmeR*-knockout mutant (Fig. 4). We expected that an increase in PmeR expression

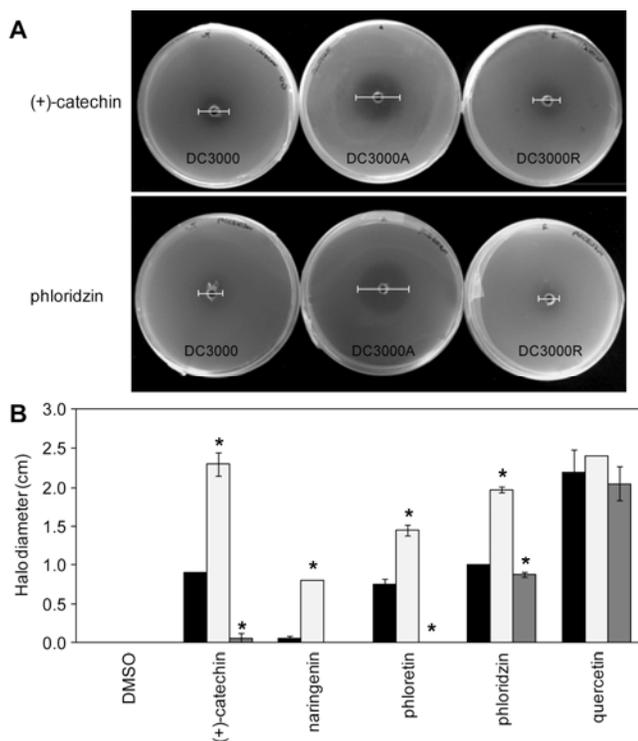


Fig. 5. Susceptibility of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 to different flavonoids. Antibiosis assays were conducted with the strains DC3000, DC3000A, and DC3000R inoculated into the Luria-Bertani medium (1% agar) to a final titer of 10^6 CFU/ml. Holes (5 mm in diameter) were made and filled with 50 μ l of different flavonoid solutions. Final amounts of each compound were: (+)-catechin, 7.3 mg; morin, 7.6 mg; naringenin, 9.3 mg; phloretin, 6.9 mg; phloridzin, 11.8 mg; and quercetin, 8.5 mg. The growth inhibition halo was photographed and measured after incubation of the plates for 24 h at 26°C. **A**, Plates of the antibiosis assay carried out with DC3000, DC3000A, and DC3000R in the presence of (+)-catechin and phloridzin. The diameter of the halos is indicated. **B**, The inhibition halo obtained for DC3000 (black), DC3000A (white), and DC3000R (gray) in the presence of the control (dimethyl sulfoxide) and flavonoid solutions were measured (in triplicate), and the mean inhibition zone (cm) calculated. Asterisks indicate that the differences with the wild-type strain are significant as determined by one-way analysis of variance ($P < 0.05$).

inhibited transcription from the *mexAB-oprM* and the *pmeR* promoters; however, we have shown that expression of both the efflux pump and PmeR were enhanced by the presence of certain chemicals (Fig. 2), which could only be achieved if the effectors that induce transcription from those promoters had a direct effect on PmeR repressor function. This prompted us to examine whether different efflux pump substrates showed inhibitory effects on the binding of PmeR to the *cis* sequences of *mexAB-oprM* and *pmeR* promoters in vitro (Fig. 7B). We performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA) with the PmeR concentration fixed at 50 nM, a concentration that was sufficient to cause complete retardation of the probe (Fig. 7B). Three antibiotics (ampicillin, chloramphenicol, and tetracycline), two biocides (methyl and butyl paraben), and six flavonoids ((+)-catechin, morin, naringenin, phloretin, phloridzin, and quercetin) were tested at 1 mM. We observed that all of

the flavonoids tested prevented PmeR binding to the probe, and the inhibitory effects of morin, naringenin, phloretin, and quercetin were prominent, whereas the effects of (+)-catechin and phloridzin were subtle. Also, clear inhibition of PmeR binding to the *pmeR-mexA* intergenic region was observed with butyl and methyl paraben. On the other hand, the antibiotics ampicillin, chloramphenicol, and tetracycline did not inhibit PmeR binding. Moreover, we observed that all the flavonoids that inhibited PmeR binding to the probe (morin, naringenin, phloretin, and quercetin) were able to disrupt the PmeR-DNA complex in vitro, releasing PmeR from its operator site (Fig. 7C). The in vitro gel retardation assay results essentially agreed with the results of the in vivo experiments (Figs. 2, 3, and 4) and indicate that the flavonoids morin, naringenin, phloretin, and quercetin and the biocides methyl and butylparaben have significant effects as modulators for PmeR, the repressor of the *mexAB-oprM* and *pmeR* genes.

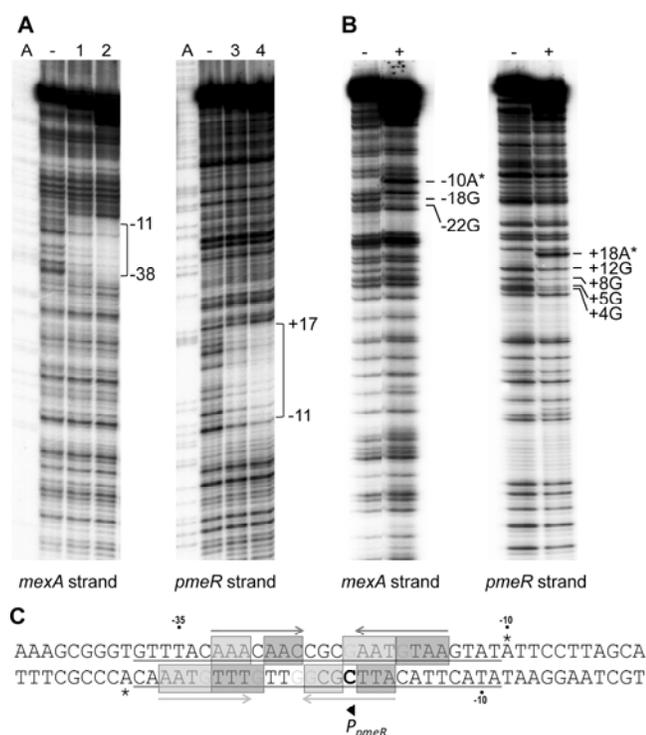


Fig. 6. Binding of PmeR to its operator DNA. **A**, Identification of the PmeR binding site in the *pmeR-mexA* intergenic region by DNase I footprinting analysis. DNA probes corresponding to the *pmeR-mexA* intergenic region 5'-end-labeled on either the top (*mexA*) or the bottom (*pmeR*) strand were prepared. The 5'-labeled probe (20 nM) was incubated in the reaction mixture without (– lanes) and with the native PmeR protein (0.5 μM, lanes 1 and 3; 1 μM, lanes 2 and 4). After partial digestion with DNase I, the DNAs were subjected to urea-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Lane A contained the products of the dideoxy sequencing reactions with the corresponding 5'-labeled primers. Nucleotide sequences protected by PmeR are indicated on the right of each panel. **B**, Identification of critical Gs for PmeR binding to its operator DNA by dimethylsulfate (DMS) footprint. DNA probes corresponding to the *pmeR-mexA* intergenic region 5'-end-labeled on either the top (*mexA*) or the bottom (*pmeR*) strand were prepared. The 5'-labeled probe (20 nM) was incubated in the reaction mixture without (– lanes) and with the native PmeR protein (1 μM, + lanes). After treatment with DMS and piperidine, the resulting DNAs were subjected to urea-PAGE. G nucleotides protected by PmeR are indicated on the right of each panel and hyper-reactivity is also indicated (*). **C**, PmeR-operator DNA binding model. PmeR binds to a 28-bp region placed between positions –11 and –38 from the *mexA* transcriptional start site (underlined), as identified by DNase I footprint assays. This operator DNA contains a pseudopalindromic sequence with two overlapping inverted repeats that can accommodate a pair of PmeR dimers each. Critical G nucleotides for PmeR binding are in gray. The *pmeR* transcription start site is indicated with an arrow.

The PmeR/MexAB-OprM system contributes to the colonization of tomato plants by *P. syringae* pv. *tomato*.

Once we established the mode of action of PmeR, we studied whether the PmeR/MexAB-OprM system contributed to the pathogenic process of DC3000. For that, we compared the abilities of the wild-type *P. syringae* pv. *tomato* and DC3000A and DC3000R mutant strains to survive and multiply in tomato leaf tissues by monitoring bacterial populations and development of disease symptoms for 9 days after inoculation with bacteria at 10^6 CFU/ml by spray. The starting populations of the three strains were similar (between 8.0×10^3 and 1.9×10^4 CFU/cm²). The population size of *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 and DC3000R reached a maximum of 2.5×10^7 CFU/cm² of leaf tissue on tomato, whereas population of the DC3000A mutant was 10-fold lower (2.3×10^6 CFU/cm²). The growth rates of *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 and DC3000A were already different at 2 days postinoculation (dpi) and, at 5 dpi, the population sizes of the wild type and the mutants started decreasing, albeit to different degrees (Fig. 8A).

The disease symptoms caused by the *pmeR*-null mutant were indistinguishable from those caused by the wild-type strain or the DC3000A mutant, which consisted of small water-soaked lesions surrounded by large regions of chlorosis that appeared 2 to 3 days after inoculation. These spots soon turned brown and the tissues surrounding the spots became yellow. However, and consistently with the lower population sizes, the symptoms caused by the DC3000A mutant were less abundant than those caused by *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 and DC3000R strains and seemed to be retarded (Fig. 8B).

These results indicate that the loss of the MexAB-OprM transporter causes a decrease in the ability of *P. syringae* pv. *tomato* to colonize tomato host plants. However, the loss of PmeR had no detectable effect in the ability of the bacterium to colonize the plant and provoke symptoms.

DISCUSSION

Several roles have been proposed for the RND pumps. They could function as efflux systems for undesirable metabolic by-products or they could play a more active role in cellular metabolism. The expression of these efflux pumps should then be controlled in response to specific physiological signals related to the role of the transporter in normal cell metabolism. Alternatively, they could be involved in the resistance to toxic compounds ordinarily present in the environment, produced by hosts or other microorganisms. Studies of several local transcriptional regulators have shown that they act by directly binding to a wide range of toxic compounds, similar to that exported by the membrane protein whose expression they

control, thereby facilitating the induction of efflux pump genes in response to the presence of diverse toxic substances (Chuanchuen et al. 2002; Grkovic et al. 1998; Lomovskaya et al. 1995; Ma et al. 1996; Terán et al. 2003, 2006). However, the large majority of known pump substrates and regulator ligands are synthetic compounds, suggesting that further research is required to identify natural substrates and ligands for these proteins.

Stoitsova and associates (2008) and the results of this work show that the *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 MexAB-OprM transporter has a broad substrate range, which confers resistance to multiple antibiotics (β -lactams, cephalosporins, quinolones, tetracycline, and chloramphenicol), plant secondary metabolites (flavonoids such as berberine, (+)-catechin, morin, naringenin, phloridzin, and phloretin), or biocides (butylparaben and methylparaben, among others). This cross-resistance to antibiotics, biocides, and plant antimicrobial compounds has been observed in other bacteria (i.e., *P. putida* DOT-T1E TtgABC and KT2442 MepABC efflux pumps have been involved in multiple organic solvent and antibiotic resistance) (Fukumori et al. 1998; Ramos et al. 1998). In plant-pathogenic bacteria such as *Erwinia amylovora* and *E. chrysanthemi*, AcrAB-TolC transporter confers resistance to antibiotics, toxic compounds (such as crystal violet), and compounds derived from plants such as phloretin and naringenin (Burse et al. 2004; Maggiorani-Valecillos et al. 2006).

In this study, we have analyzed the expression of the *mexAB-oprM* efflux pump operon and the regulatory gene *pmeR* at the transcriptional level and investigated the role of the PmeR protein in this process. We observed that *mexAB-oprM* and *pmeR* were expressed in vivo at a relatively high and moderate basal level, respectively, and that addition of the structurally dissimilar chemicals (butyl and methylparaben, or flavonoids such as phloretin and naringenin), which are also substrates of the MexAB-OprM transporter, resulted in derepression of the *mexAB-oprM* and *pmeR* promoters in vivo (Figs.

2, 3, 4, and 7). We demonstrate that the antimicrobial-dependent induction of the *P. syringae* pv. *tomato* multidrug efflux pump MexAB-OprM and its regulatory gene, *pmeR*, is mainly controlled by the repressor protein PmeR (Figs. 3, 4, 6, and 7), although we cannot discard the involvement of other regula-

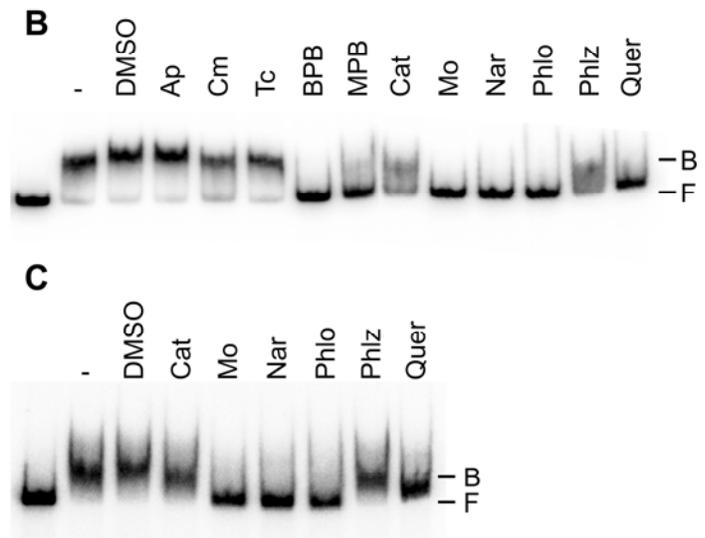
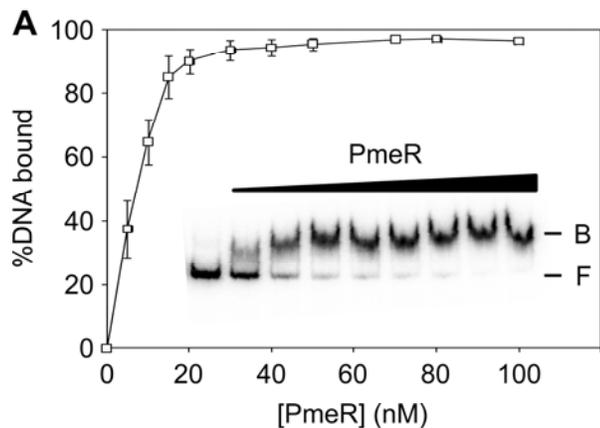


Fig. 7. A, In vitro binding affinity of PmeR to the *pmeR-mexA* intergenic region. The 263-pb fragment containing the *pmeR-mexAB-oprM* intergenic region (1 nM) was incubated without protein or with increasing concentrations of native PmeR, which increased the percentage of DNA bound. Results shown in the graphic are the mean of four different experiments with standard deviations. Representative electrophoretic mobility shift assays (EMSA) are also shown in the figure (lane 1, without protein; lanes 2 to 9 with 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, and 80 nM native PmeR). **B**, Evaluation of the inhibitory effect of flavonoids on PmeR binding to the *pmeR-mexA* intergenic region by gel retardation. The 32 P-labeled probe (1 nM) was incubated without protein (lane 1) and with 50 nM PmeR (lanes 2 to 14) in the absence (lane 2) or in the presence of 1 mM of the following effectors: (+)-catechin (Cat), morin (Mo), naringenin (Nar), phloretin (Phlo), phloridzin (Phlz), quercetin (Quer), ampicillin (Ap), chloramphenicol (Cm), tetracycline (Tc), butylparaben (BPB), and methylparaben (MPB). Experiments were repeated three times with similar outcome and the results of representative experiments are shown. **C**, Effect of flavonoids on the PmeR-DNA complex. EMSAs were carried out as above, with the only difference that the effectors were added 10 min after the incubation of PmeR with the probe.

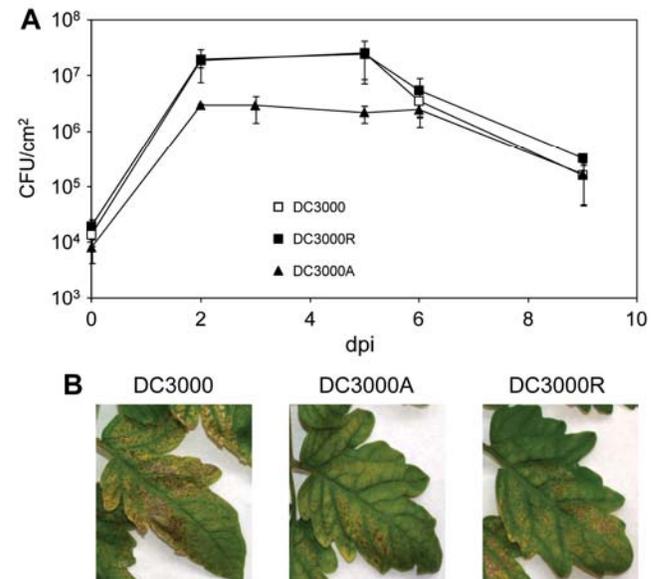


Fig. 8. Bacterial growth and symptom development on tomato leaves. A, Time course of in planta growth of different *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* strains: DC3000, DC3000A, and DC3000R. Development of CFU on the primary leaves of tomato plants at 0, 2, 3, 5, 6, and 9 days after artificial inoculation with approximately 10⁶ CFU/ml by spray. Data represent the average of four experiments \pm standard error. **B**, Development of symptoms induced on primary leaves of tomato plants at 9 days after artificial inoculation with *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (wild type) and DC3000R and DC3000A mutants at 10⁶ CFU/ml by spray.

tory proteins, including global regulators, given that the addition of phloretin slightly increased expression of *mexA* in the PmeR-deficient mutant (Figs. 3 and 4). By both in vitro EMSA (Fig. 7) and DNase I and DMS protection (Fig. 6) experiments, we have identified the operator site for PmeR in the *pmeR-mexA* intergenic region and have shown that PmeR is released from its operator DNA site by binding to the same compounds that induce expression in vivo (Figs. 2, 3, 4, and 7). PmeR is a member of the TetR family of transcriptional regulators, all of which share a highly homologous N-terminal DNA-binding domain with a helix-turn-helix motif and other conserved sequence signatures (Ramos et al. 2005). We propose that PmeR, similar to most characterized regulators of the TetR family, represses transcription through operator binding mediated by its N-terminal domain, and this repression is relieved by binding of structurally dissimilar molecules to their C-terminal ligand-binding and dimerization domain. However, within the TetR family members, there are proteins which bind to 11-bp operator sites, such as EF0787, and others, such as CgmR or QacR, which bind to longer (30- and 26-bp, respectively) operators (Yu et al. 2010). PmeR binds to an imperfect inverted repeat operator sequence which overlaps the *mexAB-oprM* and *pmeR* promoters, specifically with the -10 region of the *pmeR* promoter and its transcription start site, and the -35 region of the *mexAB-oprM* promoter. This operator site comprises 11-bp half sites and has a complex symmetry, with two possible overlapping pseudopalindromic sequences (Fig. 6). This unique position of the PmeR binding site with respect to both divergent promoter regions is consistent with the coregulation of these promoters observed in vivo.

Based on all the evidence obtained in this work, we propose a model for PmeR binding to its operator DNA similar to that described for QacR (Schumacher et al. 2002) (i.e., the cooperative binding of two PmeR dimers to a 28-bp pseudopalindrome operator DNA sequence). In this model, each half site would receive two monomers belonging to different dimers (Fig. 6C). Hence, the PmeR repressor may hinder access of RNA polymerase to *mexAB-oprM* and *pmeR* promoters in the same way that TetR inhibits expression from its cognate promoters (Orth et al. 2000). Furthermore, the location of the operator site with respect to the promoters and transcription initiation sites of *mexAB-oprM* and *pmeR* explains why $P_{mexAB-oprM}$ is expressed in vivo at a relatively high level, whereas the P_{pmeR} basal level is lower, and how PmeR adjusts its own levels of expression in response to the different types and concentrations of effectors (Figs. 2 and 7). The repression of *mexAB-oprM* and *pmeR* transcription by PmeR could be overcome by the addition of butyl and methylparaben, morin, naringenin, phloretin, and quercetin, resulting in the induction of *mexAB-oprM* and *pmeR* expression (Figs. 2 and 7). Those structurally unrelated molecules activate pump expression by binding to free PmeR and inhibiting its binding to its operator site or to the PmeR-DNA complex and releasing PmeR from its operator site, therefore allowing transcription to initiate. Direct recognition of structurally dissimilar compounds rather than the involvement of a secondary messenger appears to be a common feature in bacterial multidrug transporter regulation by TetR regulators (Yu et al. 2010). Based on the structural studies, it has been established that the remarkable ability of those proteins to recognize a structural diversity of compounds is enabled by a voluminous multisite ligand-binding pocket, which comprises distinct and overlapping subpockets (Alguel et al. 2007; Brooks et al. 2007; Madoori et al. 2009; Murray et al. 2004; Schumacher et al. 2001, 2004). Overall, the results show that both *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 RND transporter MexAB-OprM and its cognate repressor PmeR possess multidrug recognition properties. PmeR functions as a mul-

tidrug-binding regulator that specifically modulates its own expression and the expression of the *mexAB-oprM* efflux pump in response to the presence of different antimicrobials, some of which are substrates of the transporter. In this regard, it is important to highlight that the effector profile of PmeR is narrower than the substrate range of MexAB-OprM, which means that pump expression is induced only in the presence of some of the compounds that it can expel. The broad substrate specificity of this transporter is an evolutionary adaptation of the bacteria to survive in different environments. However, the large majority of known pump substrates and regulator ligands are synthetic compounds, some of which are unlikely to be found in the natural habitat of the bacteria. Therefore, plant compounds or metabolites from other bacteria may be the natural substrates or ligands present in *P. syringae* pv. *tomato* habitat, and synthetic compounds expelled by the pumps (or recognized by the regulators) resemble the intended substrates.

We have identified compounds produced by plants that can act as effectors of the regulatory protein and substrates of the efflux pump. Moreover, some plant signal molecules such as phloretin and naringenin can significantly promote *mexAB-oprM* and *pmeR* gene expression, reaching levels of induction up to 2.5 and 2 times, respectively (Fig. 2). Because the expression of MexAB-OprM increases in the presence of plant antimicrobials, which would greatly reduce the effect of these plant products on initial bacteria-plant interactions, we thought that mutants overexpressing the MDR efflux pump would exhibit increased survival or colonization rates. For this purpose, we carried out infection assays with knock-out mutants on the regulator and the efflux pump to study colonization and virulence in susceptible plants, observing that the disruption of *pmeR* had no significant effect on virulence or colonization of the host plant (Fig. 8). However, the disruption of *mexAB-oprM*, the efflux pump structural genes, did result in a decreased ability of the bacteria to colonize the host plant (Fig. 8).

For decades of medical research, flavonoids have been reported to possess numerous useful properties, including antimicrobial activity. The antibacterial mechanisms of action of several flavonoids have been elucidated and shown to act on multiple cellular targets (Cushnie and Lamb 2005). The first demonstrated target was DNA gyrase (Ohemeng et al. 1993) and the relevant inhibition mechanism by quercetin was proposed to be through two parallel means. One is the binding of quercetin to DNA through hydrophobic interactions and the other is related to its competition with ATP for the substrate binding site of the gyrase (Papler et al. 2003). Although knowledge about the antibacterial action of various flavonoids is accumulating, little is known about how the bacteria specifically react to those plant products and how this response is integrated into the cell regulatory circuits. We have characterized one mechanism of bacterial resistance to different flavonoids in the plant pathogen *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, the MDR efflux pump MexAB-OprM. Flavonoids are the best substrates of MexAB-OprM and the best inducers of its expression at a transcriptional level. MexAB-OprM has been shown to be involved in tolerance to a broad range of compounds and in the ability to multiply in planta (Stoitsova et al. 2008; this work). Therefore, we propose that our model MexAB-OprM efflux pump from *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 mediates resistance to antimicrobial compounds produced by plants, conferring protection that facilitates the initial survival in its ecological niche, the leaf surface; subsequent colonization of the host; and disease. Additionally, MexAB-OprM is able to remove other antimicrobial agents, such as antibiotics, which could allow *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 to compete effectively against other epiphytic bacteria found in

leaves. In this sense, we have shown that there is a common pathway for the response to structurally and functionally different antimicrobial compounds: antibiotics, biocides, and plant secondary products such as flavonoids.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and culture medium.

The bacterial strains and plasmids used in this study are shown in Table 2. *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Cuppels 1986) and mutants were routinely grown in Luria-Bertani (LB) medium (Sambrook et al. 1989) at 28°C. When required, the following antibiotics were added to the cultures or plates to reach final concentrations of 10 µg/ml for rifampicin, 10 µg/ml for tetracycline, 25 µg/ml for kanamycin, and 100 µg/ml for ampicillin.

We constructed fusions of the promoters of the *mexAB-oprM* operon and *pmeR* gene promoter to a promoterless *lacZ* gene in the low-copy-number (two to four copies per cell) pMP220 vector (Spaink et al. 1987). The *pmeR-mexA* intergenic region (254 bp) was amplified by PCR from *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 chromosomal DNA, which was isolated with Wizard Genomic, DNA purification kit (Promega Corp., Madison, WI, U.S.A.), with primers incorporating *EcoRI* and *PstI* restriction sites—*EcoRI*-PmexA1 (5'-AAAAGAATTTCGA CCTCAAAGATTC-3') and PmexA-PstI2 (5'-AAAAGTGC AGCCTCGGGGCAGG-3')—to create a fusion of the *mexAB-oprM* promoter to '*lacZ*'; and with primers PstI-PpmeR1 (5'-AAAAGTGCAGAACACCTCAAAGATTC-3') and PpmeR-*EcoRI*2 (5'-AAAAGAATTTCCTCGGGGCAGG-3') to create a fusion of the *pmeR* promoter to '*lacZ*'. Upon amplification, DNA was digested with *EcoRI* and *PstI* and ligated to *EcoRI*-*PstI*-digested pMP220 to produce pPV1A (*P_{mexA}::lacZ*) and pPV2R (*P_{pmeR}::lacZ*). Plasmids pPV1A and pPV2R were sequenced to make sure that no mutations were introduced in the corresponding promoter regions. These plasmids were electroporated into *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 or its derivative mutants as described by Enderle and Farwell (1998). Cells in 0.2-cm cuvettes were submitted to a high-voltage pulse (1,800 V) for 5 ms by using a MicroPulser electroporation apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.), and transformants were selected in LB agar plates supplemented with tetracycline.

We constructed a plasmid bearing the *pmeR* gene for heterologous complementation of the respective deficient mutant. A fragment including the *pmeR* gene was amplified by PCR from *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 chromosomal DNA using extPmeR_F (5'-TGAACCGCGCTTGCGCTCAT-3') and PpmeR-EcoRI.2 (5'-AAAAGAATTCTCGGGGCAGG-3') oligonucleotides. This DNA was cloned into pCR-XL-TOPO vector (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, U.S.A.) and sequenced. After digestion with *EcoRI*, the fragment was ligated to *EcoRI*-digested pJB3Tc19. The resulting plasmid, pPV4R, carried a 1.36-kb fragment with the *pmeR* gene from *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.

Construction of a *pmeR* and *mexA*-null mutants of *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.

We constructed the *pmeR*-null mutant (DC3000R) by gene replacement, for which we first knocked out the *pmeR* gene in vitro. Plasmid pPVG-R is a pGEM-T (Promega Corp., Madison, WI, U.S.A.) derivative that carries a 1,805-bp fragment harboring the *pmeR* gene and flanking DNA. This plasmid bears an artificial *EcoRI* site around the middle of the *pmeR* ORF. Upon digestion with *EcoRI*, the plasmid was ligated to a 2.25-kb fragment bearing the Ω Km interposon from pHP45 Ω Km (Fellay et al. 1987) to yield the plasmid pPVG-R Ω Km, which was used for in vivo gene replacement. The suicide plasmid pPVG-R Ω Km encodes resistance to ampicillin (Ap) and kanamycin (Km) and was electroporated into *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Enderle and Farwell 1998). Transformants that had acquired the inactivated gene (Km resistant [Km^r]) were selected. Among the Km^r clones, we searched for Ap (250 µg/ml)-sensitive (Ap^s) ones, which were expected to be the result of a double-recombination event. One of the Km^r/Ap^s clones, called DC3000R, was chosen and confirmed by Southern blot to have the wild-type *pmeR* gene replaced by the mutant allele *pmeR:: Ω Km* (not shown).

A *mexA*-null mutant (DC3000A) selectable with antibiotic (Km) was also constructed by gene replacement. We first constructed the plasmid pPVG-A, a pMBL (Dominion, Madrid) derivative bearing a 2,106-bp fragment with the *mexA* gene and flanking DNA. The plasmid was digested with *Eco47III* (approximately 440 bp after the *mexA* first ATG) and ligated to the Ω Km interposon (with added *Eco47III* sites in both ends)

Table 2. Bacterial strains and plasmids

Strain, plasmid	Genotype	Reference
Strains		
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>		
DC3000	Rif ^r	Cuppels 1986
DC3000R	Km ^r , <i>pmeR::ΩKm</i>	This work
DC3000A	Km ^r , <i>mexA::ΩKm</i>	This work
<i>Escherichia coli</i>		
B834(DE3)	F ⁻ , <i>ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met</i>	Novagen
Plasmids		
pET29a(+)	Km ^r , protein expression vector	Novagen
pCR-XL-TOPO	Km ^r , cloning vector	Invitrogen Corp.
pGEM-T	Ap ^r , T/A cloning vector	Promega Corp.
pHP45 Ω Km	Ap ^r , carries the 2.25-kb Ω Km interposon	Fellay et al. 1987
pJB3Tc19	Ap ^r , Tc ^r , cloning vector, <i>P_{lac}</i> promoter	Blatny et al. 1997
pMP220	Tc ^r , ' <i>lacZ</i> promoter probe plasmid	Spaink et al. 1987
pMBL	Ap ^r , T/A-cloning vector	Dominion-MBL
pPV1A	Tc ^r , pMP220 bearing <i>mexAB-oprM</i> promoter region	This work
pPV2R	Tc ^r , pMP220 bearing <i>pmeR</i> promoter region	This work
pPV3	Km ^r , pET29a(+) derivative vector used to produce native PmeR	This work
pPV4R	pJB3Tc19: <i>pmeR</i>	This work
pPVG-R	Ap ^r , 1,805-bp chromosomal fragment bearing <i>pmeR</i> cloned into pGEM-T	This work
pPVG-R Ω Km	pPVG-R with Ω Km inserted into the <i>EcoRI</i> site	This work
pPVG-A	Ap ^r , 2,106-bp chromosomal fragment bearing <i>mexA</i> cloned into pMBL	This work
pPVG-A Ω Km	pPVG-A with Ω Km inserted into the <i>Eco47III</i> site	This work

^a Rif^r, Km^r, Ap^r, and Tc^r stand for resistance to rifampicin, kanamycin, ampicillin, and tetracycline, respectively.

to yield the plasmid pPVG- Ω Km, which was used for in vivo gene replacement. The selection and check up of the *mexA::* Ω Km mutant was as above. Given the polar effect of the Ω Km insertion, this mutant was, in fact, an *mexAB-oprM*-null mutant.

Preparation of mRNA.

P. syringae pv. *tomato* DC3000, DC3000R, and DC3000A were grown overnight in LB medium supplemented with the appropriate antibiotics at 28°C. Cells were then diluted to an initial optical density at 660 nm (OD₆₆₀) of 0.1 and incubated with shaking at 28°C in the absence or in the presence of sublethal concentrations of phloretin (0.3 mM for DC3000 and DC3000R and 0.05 mM for the DC3000A). The cells were pelleted at different OD₆₆₀ values, depending on the experiment, and were processed for RNA isolation using TRI Reagent LS (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, U.S.A.) according to the manufacturer's instructions, except that the TRI Reagent was preheated at 70°C and the lysis step was carried out at 65°C. The RNA obtained was treated with RNase-free DNase I (Qiagen, Hilden, Germany) followed by purification with an RNeasy mini kit (Qiagen). RNA concentration was determined spectrophotometrically and its integrity was assessed by agarose gel electrophoresis.

Primer extension analysis.

mRNAs of the *mexAB-oprM* pump operon and the *pmeR* regulator were reverse transcribed with SuperScript III (Invitrogen) using a specific oligonucleotide primer complementary to a sequence located 107 to 126 nucleotides from the transcription start point of each gene (PEmexA1 [5'-GAACGGT AACAGCTGGCTTG-3'] and PEpmeR_IR [5'-ATGCATCTG GTGCATGCC-3'] for *mexAB-oprM* and *pmeR*, respectively). Oligonucleotides were end-labeled with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase, and 0.5 to 1 pmol was annealed to 20 μ g (for *mexAB-oprM*) or 30 μ g (for *pmeR*) of total RNA for 5 min at 90°C, followed by 5 min at 65°C. cDNA was synthesized by using SuperScript III (2 h at 58°C) and analyzed in urea-polyacrylamide sequencing gels. The obtained cDNA bands were visualized by using a Phosphorimager system (Personal FX equipment; Bio-Rad).

Quantitative RT-PCR assay.

Total RNA (1 μ g) treated with RNase-free DNase I Set (Qiagen) was retrotranscribed to cDNA with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) using random hexamers as primers. The lack of genomic DNA contamination was checked by PCR amplification of RNA samples without prior cDNA synthesis. The specific primer pairs used to amplify cDNA were 5'-CAGGACGACCGCTTCCGTGTGG-3' and 5'-CCTTGGCACTGTTGGCGTTGGCTTC-3' for *mexA*, 5'-CGGCAAGGGTCGCAATGTCAGC-3' and 5'-TCGCACCA AAGAGGAAGCTCAGATCACC-3' for *pmeR*, and 5'-GGCA AGGTCACCCGCTTCAAGGAAT-3' and 5'-GACCGCCACG CTTGTACTCAGGGAAC-3' for *gyrA*. Primer efficiency was determined as in Michán and Pueyo (2009) and was optimal (\approx 100%) for all the pairs. Real-time RT-PCRs were performed in triplicate. No primer dimers were detected. Real-time PCR conditions were as detailed in Michán and Pueyo (2009): each 25- μ l reaction contained 50 ng of the target cDNA, 300 nM each primer, and iQ SyBrGreen Supermix (Bio-Rad). Following PCR, melt-curve analysis was performed to confirm the specificity of the amplification reaction. Relative transcript abundance was calculated using the $\Delta\Delta$ cycle threshold (Ct) method (Livak and Schmittgen 2001). *P. syringae* pv. *tomato* transcriptional data were normalized to the housekeeping gene *gyrA*. The expression of a given gene relative to *gyrA* was calculated as the difference in quantitative PCR threshold cycles

(Δ Ct = Ct_{gene of interest} - Ct_{gyrA}). The expression of each gene was determined with the control treatment (wild type in the absence of phloretin) as the difference between Δ Ct values ($\Delta\Delta$ Ct). One PCR cycle represents a twofold difference in template abundance; therefore, fold-change values are calculated as $2^{-\Delta\Delta$ Ct}.

β -gal assays.

Bacterial cells were inoculated from fresh LB agar plates that had been supplemented with the appropriate antibiotics and in which the bacteria were allowed to grow overnight at 28°C. Cultures were diluted to an initial OD₆₆₀ of 0.1 in the same medium supplemented or not with the chemicals to be tested and were then incubated at 28°C with shaking. The compounds tested in the β -gal assays were usually added between 0.08 and 1 mM (sublethal concentrations), and were dissolved in DMSO when needed (note that the latter did not interfere with the induction assays in this study). β -Gal activity was determined in triplicate in permeabilized cells along the growth curve or when cultures reached an OD₆₆₀ of 2 (Miller 1972). Results are the mean of at least five different experiments.

Antimicrobial agent susceptibility tests.

The MIC of the tested compounds was determined in LB medium by the microtiter broth dilution method (Amsterdam 1991). Microtiter plate wells containing each 100 μ l of LB were inoculated with 10⁶ CFU/ml and incubated for 24 h at 28°C. The growth was then analyzed and the MIC corresponded to the minimal concentration at which growth was inhibited by at least 90%.

Antibiosis assays were conducted on plates with the bacterial strains grown to a OD₆₆₀ of 1 (approximately 10⁸ CFU/ml), which were then inoculated into the LB (1% agar) to a final title of 10⁶ CFU/ml before laying the plates. Holes (5 mm in diameter) were punched into each plate by a cork borer and filled with 50 μ l of different flavonoid solutions (in DMSO). After 24 h of incubation at 26°C, the plates were monitored for zones of growth inhibition in the bacterial lawn.

Overexpression and purification of PmeR.

A 672-bp fragment containing the *pmeR* gene was amplified from *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 chromosomal DNA by PCR with primers 5-pmeR_Pto (5'-AAAAACATATGGTCC GTCGAACCAAAG-3') and 3-pmeR_Pto (5'-aaaaaaAAGCTT TCATCATAACCTTTCACG-3'), which generated *Nde*I and *Hind*III restriction sites, respectively (underlined), and the latest also included two stop codons (in bold). The PCR products were restricted with the above enzymes and subsequently ligated into the pET29a(+) vector (NovagenEMD Chemicals Inc, Gibbstown, NJ, U.S.A.) previously digested with *Nde*I and *Hind*III. The resulting plasmid was termed pPV3.

For the purification of native PmeR, pPV3 was transformed into *Escherichia coli* B834(DE3). The cells were grown at 30°C in 2-liter Erlenmeyer flasks containing 1 liter of 2 \times YT culture medium (Sambrook et al. 1989) supplemented with Km at 25 μ g/ml. For PmeR production, protein expression was induced at an OD₆₆₀ of 0.5 to 0.6 by adding 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside. Cells were grown for another 3 h at 18°C and subsequently harvested by centrifugation. The pellet resulting from a 1-liter culture was resuspended in 30 ml of buffer A (20 mM Tris-HCl [pH 6.4], 20 mM NaCl, 5% [vol/vol] glycerol, 0.1 mM EDTA, and protease inhibitor mixture) (Complete; Diagnostic GmbH, Mannheim, Germany) and broken by treatment with lysozyme and French press at 20 μ g/ml. Following centrifugation at 13,000 \times g for 60 min, the PmeR protein was predominantly present (more than 80%) in

the soluble fraction. The supernatant was loaded onto a Hitrap Heparin HP column (5 ml) (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) equilibrated with buffer A and eluted with a gradient of 0.02 to 0.5 M NaCl. Fractions containing PmeR were pooled, concentrated to 4 ml by ultrafiltration using an Amicon 8050 apparatus (Millipore, Billerica, MA, U.S.A., and dialyzed against buffer B (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 250 mM NaCl, 10% [vol/vol] glycerol, 0.1 mM EDTA, and 1 mM dithiothreitol [DTT]). The sample was then submitted to size-exclusion chromatography using a Sephacryl HR-200 column (GE Healthcare). Eluted fractions of PmeR were pooled, concentrated using the above equipment, and dialyzed against buffer C (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 250 mM NaCl, 10% [vol/vol] glycerol, 0.1 mM EDTA, and 5 mM DTT) for protein storage at -70°C . Protein concentrations were determined using the Bio-Rad Protein Assay kit.

EMSA.

The DNA probe was a 263-bp fragment containing the *pmeR-mexA* intergenic region obtained from DC3000 chromosomal DNA by PCR with the PstI-PpmeR1 (5'-AAAAAAGCTGCAGAAGACCTCAAAGATTC-3') and PpmeR-EcoRI.2 (5'-AAAAGAATTCCTCGGGCAGG-3') pair of primers. The PCR product was isolated from an agarose gel by using the QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) and was radiolabeled at its 5' ends with [γ - ^{32}P]ATP and T4 polynucleotide kinase. The labeled probe (1 nM; approximately 10,000 cpm) was then incubated with the indicated concentrations of purified PmeR in 10 μl of STAD (25 mM Tris-acetate [pH 8.0], 8 mM Mg-acetate, 10 mM KCl, 3.5% [wt/vol] polyethylene glycol-8000, and 1 mM DTT) supplemented with poly(dI-dC) at 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and bovine serum albumin at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. When present, effectors were added to the binding reaction mixture at 1 mM. The reaction mixtures were incubated for 10 min at 30°C , and samples were run on 4.5% (wt/vol) native polyacrylamide gels (Bio-Rad Mini-Protean II) for 2.5 h at 60 V on ice in Tris-borate EDTA. Results were analyzed with Personal FX equipment and Quantity One software (Bio-Rad).

Footprinting assays.

The DNA probe was the same 263-bp PCR fragment containing the *pmeR-mexA* intergenic region used in the gel mobility shift assays. For the footprint on the top strand, the PCR was carried out with primers PstI-PpmeR1 (end labeled with [γ - ^{32}P]ATP as described above) and PpmeR-EcoRI.2. For the footprint on the bottom strand, the same primers were used but, in this case, PpmeR-EcoRI.2 was end labeled. Purified labeled probe (20 nM) was incubated without or with PmeR (500 nM dimer) in a 20- μl reaction volume of STAD (25 mM Tris-acetate [pH 8.0], 8 mM Mg-acetate, 10 mM KCl, 3.5% [wt/vol] polyethylene glycol-8000, and 1 mM DTT) supplemented with poly(dI-dC) at 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and bovine serum albumin at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The mixtures were incubated for 10 min at 30°C before being treated with DNase I or DMS, as described previously (Guazzaroni et al. 2004; Rojas et al. 2003).

Infection assays.

Seed of *Solanum lycopersicum* 'MoneyMaker' (a *P. syringae* pv. *tomato* S line) were germinated and grown with cycles of 16 h of light, 8 h of darkness, and 70% relative humidity. *P. syringae* strains, grown on LB for 48 h at 28°C , were suspended in 10 mM MgCl_2 and the OD_{660} was adjusted to 0.5 (10^8 CFU/ml). Further serial dilutions were carried out to obtain a suspension of the desired title for different dose inoculations. Four- to five-week-old plants were inoculated with the bacterial suspension using an airbrush. The control plants were inoculated with a solution of 10 mM MgCl_2 . For infections,

individual inocula (10^6 CFU/ml) of the strains were sprayed into different plants and the analysis of the evolution of symptoms and sampling were performed 3 h after inoculation (time 0, input) and several days after inoculation to determine output CFU. Bacteria were recovered from the infected leaves using a 10-mm-diameter cork borer. Five disks (3.9 cm^2) per plant were homogenized by mechanical disruption into 1 ml of 10 mM MgCl_2 and counted by plating serial dilutions onto LB plates with the corresponding antibiotics.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants BFU2007-60272 and BFU2008-00086 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación and P08-CVI-3475 from the Junta de Andalucía to M.-T. Gallegos, all of them cofinanced by European Regional Development Fund. P. Vargas was supported by a JAE-Pre fellowship from the CSIC, also cofinanced by European Regional Development Fund. We thank I. Forte for technical assistance.

LITERATURE CITED

- Alguel, Y., Meng, C., Teran, W., Krell, T., Ramos, J. L., Gallegos, M. T., and Zhang, X. 2007. Crystal structures of multidrug binding protein TtgR in complex with antibiotics and plant antimicrobials. *J. Mol. Biol.* 369:829-840.
- Amsterdam, D. 1991. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. Pages 53-105 in: *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd ed. V. Lorian, ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Aramaki, H., Sagara, Y., Kabata, H., Shimamoto, N., and Horiuchi, T. 1995. Purification and characterization of a *cam* repressor (CamR) for the cytochrome P-450cam hydroxylase operon on the *Pseudomonas putida* CAM plasmid. *J. Bacteriol.* 177:3120-3127.
- Barabote, R. D., Johnson, O. L., Zetina, E., San Francisco, S. K., Fralick, J. A., and San Francisco, M. J. D. 2003. *Erwinia chrysanthemi* *tolC* is involved in resistance to antimicrobial plant chemicals and is essential for phytopathogenesis. *J. Bacteriol.* 185:5772-5778.
- Blatny, J. M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H. C., Haugan, K., and Valla, S. 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:370-379.
- Brooks, B. E., Piro, K. M., and Brennan, R. G. 2007. Multidrug binding transcription factor QacR binds the bivalent aromatic diamidines DB75 and DB359 in multiple positions. *J. Am. Chem. Soc.* 129:8389-8395.
- Burse, A., Weingart, H., and Ullrich, M. 2004. The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:43-54.
- Chuanchien, R., Narasaki, C. T., and Schweizer, H. P. 2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J. Bacteriol.* 184:5036-5044.
- Cornelis, G. R., and van Gijsegem, F. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:735-774.
- Cuppels, D. A. 1986. Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:323-327.
- Cushnie, T. P., and Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26:343-356. Erratum in: *Int. J. Antimicrob. Agents* 27:181.
- Dixon, R. A. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411:843-847.
- Enderle, P. J., and Farwell, M. A. 1998. Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* 25:954-956, 958.
- Eswaran, J., Koronakis, E., Higgins, M. K., Hughes, C., and Koronakis, V. 2004. Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14:741-747.
- Fellay, R., Frey, J., and Krisch, H. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene* 52:147-154.
- Fukumori, F., Hirayama, H., Takami, H., Inoue, A., and Horikoshi, K. 1998. Isolation and transposon mutagenesis of a *Pseudomonas putida* KT2442 toluene-resistant variant: involvement of an efflux system in solvent resistance. *Extremophiles* 2:395-400.
- Grkovic, S., Brown, M. H., Roberts, N. J., Paulsen, I. T., and Skurray, R. A. 1998. QacR is a repressor protein that regulates expression of the *Staphylococcus aureus* multidrug efflux pump QacA. *J. Biol. Chem.* 273:18665-18673.
- Guazzaroni, M. E., Terán, W., Zhang, X., Gallegos, M. T., and Ramos, J.

- L. 2004. TtgV bound to a complex operator site represses transcription of the promoter for the multidrug and solvent extrusion TtgGHI pump. *J. Bacteriol.* 186:2921-2927.
- Guilfoile, P. G., and Hutchinson, C. R. 1992. The *Streptomyces glaucescens* TcmR protein represses transcription of the divergently oriented *tcmR* and *tcmA* genes by binding to an intergenic operator region. *J. Bacteriol.* 174:3659-3666.
- Hearn, E. M., Dennis, J. J., Gray, M. R., and Foght, J. M. 2003. Identification and characterization of the *embABC* efflux system for polycyclic aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas fluorescens* cLP6a. *J. Bacteriol.* 185:6233-6240.
- Hernández, A., Maté, M. J., Sánchez-Díaz, P. C., Romero, A., Rojo, F., and Martínez, J. L. 2009. Structural and functional analysis of SmeT, the repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *J. Biol. Chem.* 284:14428-14438.
- Hillen, W., and Berens, C. 1994. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:345-369.
- Hirooka, K., Kunikane, S., Matsuoka, H., Yoshida, K., Kumamoto, K., Tojo, S., and Fujita, Y. 2007. Dual regulation of the *Bacillus subtilis* regulon comprising the *lmrAB* and *yxzGH* operons and *yxzF* gene by two transcriptional repressors, LmrA and YxzF, in response to flavonoids. *J. Bacteriol.* 189:5170-5182.
- Johanesen, P. A., Lyras, D., Bannam, T. L., and Rood, J. I. 2001. Transcriptional analysis of the *tet(P)* operon from *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 183:7110-7119.
- Kang, H., and Gross, D.C. 2005. Characterization of a resistance-nodulation-cell division transporter system associated with the *syr-syp* genomic island of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5056-5065.
- Kim, J., Kim, J. G., Kang, Y., Jang, J. Y., Jog, G. J., Lim, J. Y., Kim, S., Suga, H., Nagamatsu, T., and Hwang, I. 2004. Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Mol. Microbiol.* 54:921-934.
- Li, X. Z., and Nikaido, H. 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69:1555-1623.
- Lisser, S., and Margalit, H. 1993. Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* 21:1507-1516.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25:402-408.
- Lomovskaya, O., Lewis, K., and Matin, A. 1995. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J. Bacteriol.* 177:2328-34.
- Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H., and Hearst, J. E. 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol. Microbiol.* 19:101-112.
- Madoori, P. K., Agustindari, H., Driessen, A. J., and Thunnissen, A. M. 2009. Structure of the transcriptional regulator LmrR and its mechanism of multidrug recognition. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 28:156-166.
- Maggiorani-Valleccillos, A., Rodríguez-Palenzuela, P., and López-Solanilla, E. 2006. The role of several multidrug resistance systems in *Erwinia chrysanthemi* pathogenesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:607-613.
- Michán, C., and Pueyo, C. 2009. Growth phase-dependent variations in transcript profiles for thioredoxin- and glutathione-dependent redox systems followed by budding and hyphal *Candida albicans* cultures. *Yeast Res.* 9:1078-1090.
- Miller, J. H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., and Yamaguchi, A. 2006. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* 443:173-179.
- Murray, D. S., Schumacher, M. A., and Brennan, R. G. 2004. Crystal structures of QacR-diamidine complexes reveal additional multidrug-binding modes and a novel mechanism of drug charge neutralization. *J. Biol. Chem.* 279:14365-14371.
- Ohemeng, K. A., Schwender, C. F., Fu, K. P., Barrett, J. F. 1993. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3:225-230.
- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W., and Hinrichs, W. 2000. Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nat. Struct. Biol.* 7:215-219.
- Osborn, A. E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8:1821-1831.
- Palumbo, J. D., Kado, C. I., and Phillips, D. A. 1998. An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J. Bacteriol.* 180:3107-3113.
- Papler, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer, T., and Jerala, R. 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306:530-536.
- Poole, K. 2003. Overcoming multidrug resistance in gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 4:128-139.
- Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D. E., and Bianco, N. 1996. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2021-2028.
- Ramos, J. L., Duque, E., Godoy, P., and Segura, A. 1998. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* 180:3323-3329.
- Ramos, J. L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M. T., Brennan, R., and Tobes, R. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69:326-356.
- Rojas, A., Segura, A., Guazzaroni, M. E., Terán, W., Hurtado, A., Gallegos, M. T., and Ramos, J. L. 2003. In vivo and in vitro evidence that TtgV is the specific regulator of the TtgGHI multidrug and solvent efflux pump of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 185:4755-4763.
- Saier, M. H., Jr., and Paulsen, I. T. 2001. Phylogeny of multidrug transporters. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12:205-213.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Schumacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A., and Brennan, R. G. 2001. Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. *Science* 294:2158-2163.
- Schumacher, M. A., Miller, M. C., Grkovic, S., Brown, M. H., Skurray, R. A., and Brennan, R. G. 2002. Structural basis for cooperative DNA binding by two dimers of the multidrug-binding protein QacR. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 21:1210-1218. Erratum in: *EMBO J.* 21:2301.
- Schumacher, M. A., Miller, M. C., and Brennan, R. G. 2004. Structural mechanism of the simultaneous binding of two drugs to a multidrug-binding protein. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 23:2923-2930.
- Spaink, H. P., Okker, R. J. H., Wijffelman, C. A., Pees, E., and Lugtenberg, B. J. J. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* 9:27-39.
- Stoitsova, S. O., Braun, Y., Ullrich, M. S., and Weingart, H. 2008. Characterization of the RND-type multidrug efflux pump MexAB-OprM of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3387-3393.
- Terán, W., Felipe, A., Segura, A., Rojas, A., Ramos, J. L., and Gallegos, M. T. 2003. The antimicrobial agent efflux pump TtgABC of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1E is induced by the presence of structurally different antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3067-3072.
- Terán, W., Krell, T., Ramos, J. L., Gallegos, M. T. 2006. Effector-repressor interactions, binding of a single effector molecule to the operator-bound TtgR homodimer mediates derepression. *J. Biol. Chem.* 281:7102-7109.
- Van Etten, H., Temporini, E., and Wasmann, C. 2001. Phytoalexin (and phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: why is it not required by all pathogens? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59:83-93.
- Yu, Z., Reichheld, S. E., Savchenko, A., Parkinson, J., and Davidson, A. R. 2010. A comprehensive analysis of structural and sequence conservation in the TetR family transcriptional regulators. *J. Mol. Biol.* 400:847-864.