



UNSAM
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

**Mecanismos globales de regulación genética
involucrados en la respuesta a la radiación
UVA en *Pseudomonas aeruginosa***

Lic. Magdalena Pezzoni

Director:

Dr. Ramón A. Pizarro

Co-Directora:

Dra. Cristina S. Costa

**Tesis presentada para optar por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología,
Mención Química, de la Universidad Nacional de San Martín.**

Buenos Aires, marzo de 2012

Mecanismos globales de regulación genética involucrados en la respuesta a la radiación UVA en *Pseudomonas aeruginosa*

RESUMEN

En condiciones naturales, las bacterias están expuestas a diversos factores de estrés ambiental. Uno de los principales factores de estrés presentes en la naturaleza es la radiación ultravioleta A (UVA) (320-400 nm), que representa la fracción mayoritaria del rango UV solar que llega a la superficie terrestre. La exposición a la radiación UVA produce efectos letales y subletales en bacterias debidos principalmente al daño oxidativo ocasionado por las especies reactivas de oxígeno generadas por este tipo de radiación.

Resultados obtenidos en nuestro laboratorio, junto con información aportada por otros autores, permiten postular que existen importantes diferencias entre los mecanismos que poseen las distintas especies bacterianas para evitar los efectos nocivos de la radiación UVA. La presencia de diferentes mecanismos protectores, además de la variación en la eficiencia en los sistemas de reparación del daño de cada especie podrían ser factores determinantes de la sensibilidad a la radiación UVA. Teniendo en cuenta la alta sensibilidad encontrada en *Pseudomonas aeruginosa*, que marca una importante diferencia respecto de otros microorganismos, se propuso como objetivo de este trabajo profundizar el estudio de los efectos de la radiación UVA en este microorganismo de gran importancia ambiental y sanitaria.

Pseudomonas aeruginosa es un microorganismo versátil que puede estar presente en ambientes tanto acuáticos como terrestres, y que además puede encontrarse como patógeno de humanos, insectos y plantas. Su gran adaptabilidad a diversos factores ambientales podría explicarse por la presencia de un genoma complejo provisto de numerosos sistemas regulatorios, entre ellos, la respuesta estricta y el sistema de quorum sensing.

Quorum sensing (QS) es un sistema de comunicación celular que depende de la acción de moléculas difusibles (señales o autoinductores). Consiste en un

mecanismo de regulación genética que actúa activando o reprimiendo la transcripción de cientos de genes en respuesta a la densidad poblacional. QS incluye dos sistemas de señales: el sistema las y el sistema rhl, cuyas señales son N-3-oxododecanoyl-L-homoserina lactona (3OC12-HSL) y N-butanoyl-L-homoserina lactona (C4-HSL), respectivamente. Entre los compuestos cuya producción está regulada por el sistema QS se encuentran algunos factores de virulencia (piocianina, elastasa, ramnolípidos) y las enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa (SOD).

Dada la naturaleza oxidativa del daño por UVA y la dependencia de las enzimas antioxidantes del sistema de QS para su expresión, se propuso investigar la participación del mecanismo de QS en la respuesta a la radiación UVA en *P. aeruginosa*. Con este propósito se evaluó la respuesta de la cepa tipo silvestre PAO1 y se comparó con la de mutantes defectivas para la síntesis de las señales intercelulares de QS 3OC12-HSL (*lasI*), C4-HSL (*rhlI*) o ambas (*lasI rhlI*). Las curvas de viabilidad mostraron que la doble mutante (*lasI rhlI*) presenta una sensibilidad significativamente mayor frente al UVA que las mutantes simples (*rhlI* y *lasI*), que a su vez presentan mayor sensibilidad que la cepa PAO1. La importancia de ambos sistemas en la respuesta a dosis letales de UVA se confirmó mediante la adición de autoinductores sintéticos al medio de crecimiento de las mutantes de QS. La irradiación bajo atmósfera de nitrógeno junto con los incrementos de los valores de quimioluminiscencia indicaron la naturaleza oxidativa del daño inducido por UVA en mutantes de QS. Las determinaciones enzimáticas previas a la irradiación de enzimas antioxidantes confirmaron que en células en fase estacionaria de crecimiento la actividad de catalasa está regulada por ambos sistemas de QS, mientras que la actividad de SOD depende principalmente del sistema *lasI*. Se observó una correlación entre la respuesta a UVA y la actividad de catalasa previa a la irradiación, lo que sugiere un rol relevante de esta enzima en la protección contra los efectos del UVA. Este resultado fue confirmado por el hecho de que una mutante *katA* deficiente en la producción de la principal catalasa de *P. aeruginosa* mostró una marcada sensibilidad de las bacterias a la radiación, similar a la observada en la cepa *lasI rhlI*. La exposición de *P. aeruginosa* a dosis subletales de UVA provocó un retraso de crecimiento descrito por primera vez en este microorganismo. Este mecanismo depende del sistema de QS rhl. Además del

retraso de crecimiento, la exposición a dosis baja de UVA inducen la síntesis del autoinductor C4-HSL, la señal correspondiente al sistema rhl.

Los resultados obtenidos en esta primera parte del trabajo, indican que ambos sistemas de QS son fundamentales en la defensa contra el daño oxidativo generado por la radiación UVA en *P. aeruginosa*, probablemente debido a su rol en la expresión de catalasa, enzima involucrada en el sistema de defensa antioxidativa.

Posteriormente se analizó en este trabajo la presencia de mecanismos adaptativos de protección a UVA en *P. aeruginosa*, evaluando la inducción de resistencia a dosis letales por pre-exposición a bajas dosis de este tipo de radiación. Se registró la presencia de un fenómeno de protección de la viabilidad celular cuando este tratamiento fue aplicado a la cepa PAO1. Esta protección no se observó en una cepa mutante *relA* derivada de PAO1, sugiriendo que el gen *relA* está involucrado en este fenómeno. El gen *relA* codifica para la principal sintetasa del regulador transcripcional ppGpp, efector del mecanismo de respuesta estricta que se activa ante situaciones de estrés nutricional.

Los resultados obtenidos en los ensayos de fotoprotección con las cepas PAO1 y su derivada *relA* se confirmaron mediante tratamiento con Serina Hidroxamato (SHX), un análogo de la serina que simula una restricción de aminoácidos con la consecuente activación de la proteína RelA y el aumento de los niveles de ppGpp. Ambas cepas fueron tratadas con SHX previo a la exposición a una dosis letal de UVA, observándose protección sólo en la cepa PAO1.

Con el propósito de analizar el mecanismo involucrado en el fenómeno de fotoprotección se estudió la participación de QS y catalasa en dicho fenómeno. El tratamiento con bajas dosis de UVA que generan fotoprotección no induce la producción de las señales de QS ni aumenta la actividad de catalasa, sugiriendo que ambos factores no están involucrados en el fenómeno. Esta hipótesis fue confirmada por el hecho de que mutantes defectivos en la síntesis de catalasa constitutiva (*katA*), catalasa inducible por estrés oxidativo (*katB*) y señales de QS (*lasI rhII*) muestran protección por pre-exposición a UVA.

En un trabajo previo se reportó que altas dosis de UVA generan daño en la membrana de *P. aeruginosa* produciendo un aumento en la sensibilidad al estrés osmótico presente en el medio de crecimiento post-irradiación. El análisis de la resistencia a shock osmótico (NaCl 1M) luego de la exposición a una dosis subletal de UVA mostró un incremento de la resistencia a alta osmolaridad de la cepa PAO1 respecto de la misma cepa no irradiada, mientras que la cepa *relA* no modificó su sensibilidad a alta osmolaridad por el pre-tratamiento. Estos resultados permiten proponer que la foto-protección podría deberse a una respuesta adaptativa de resistencia a estrés osmótico, y que el gen *relA* estaría involucrado en este mecanismo. Para testear esta hipótesis, se analizó la respuesta a UVA de células adaptadas a condiciones de estrés osmótico, para lo cual fueron crecidas en medio de alta osmolaridad (concentración subletal de NaCl). Se observó un fuerte incremento de la resistencia a UVA por el pre-tratamiento con medio de alta osmolaridad, reportándose por primera vez un fenómeno de protección cruzada entre estos dos tipos de estrés.

En suma, los resultados obtenidos en esta segunda parte del trabajo revelan la existencia de un mecanismo de protección frente a efectos letales de UVA en *P. aeruginosa* inducido por la pre-exposición a bajas dosis. Este mecanismo depende de *relA*, un gen cuya expresión está fuertemente relacionada con el estado fisiológico de las bacterias. En nuestras condiciones experimentales, la protección por dosis subletales está fuertemente relacionada con un incremento en la resistencia a estrés osmótico dependiente de *relA*, confirmándose además la presencia de un mecanismo adaptativo de protección cruzada entre el shock osmótico y la radiación UVA.

Índice

RESUMEN	7
1. Introducción	11
1.1 La Radiación Ultravioleta	11
1.1.1 Generalidades	11
1.1.2 Interacción de la radiación UV con la materia	12
1.1.2.1 Efectos de la radiación UVV- Vacío	16
1.1.2.2 Efectos de la radiación UVC	17
1.1.2.3 Efectos de la radiación UVB	17
1.1.2.4 Efectos de la radiación UVA	18
1.1.2.5 Efectos de la radiación UVA en bacterias	19
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
1.2.1 Generalidades	24
1.2.2 <i>Pseudomonas</i> y UVA	25
1.3 Sistemas globales de regulación genética	27
1.3.1 Quorum sensing (QS)	27
1.3.2 Respuesta estricta	29
2. Objetivos	31
2.1 Objetivos particulares	32
3. Materiales y Métodos	33
3.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento	33
3.2 Mantenimiento y control de las cepas bacterianas	34
3.3 Fuente de irradiación	35
3.4 Procedimientos de irradiación	36
3.4.1 Irradiación en atmósfera de aire	36
3.4.2 Irradiación en atmósfera de nitrógeno o aire	36

3.4.3	Pre-exposición a dosis subletal de UVA y posterior exposición a dosis letales	38
3.5	Curvas de sobrevivida.....	40
3.6	Retraso de crecimiento	40
3.7	Medición de Quimioluminiscencia (QL).....	40
3.8	Extracción de autoinductores.....	40
3.9	Cuantificación de autoinductores.....	41
3.9.1	Ensayo del autoinductor 3OC12-HSL.....	42
3.9.2	Ensayo del autoinductor C4-HSL.....	42
3.10	Medición de la actividad de β -galactosidasa	42
3.11	Medición de actividad de enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa (SOD) y sensibilidad al H_2O_2	43
3.12	Cuantificación de proteínas.....	44
3.13	Cuantificación de piocianina.....	44
3.14	Determinación de la capacidad antioxidante	44
3.15	Tratamiento con Serina Hidroxamato (SHX)	45
3.16	Ensayos de estrés osmótico.....	46
3.16.1	Sensibilidad a estrés osmótico.....	46
3.16.2	Shock osmótico post irradiación	46
3.16.3	Shock osmótico y respuesta a dosis letales de UVA post-tratamiento con medio de alta osmolaridad.....	47
4.	Resultados.....	48
4.1	Influencia de QS en la respuesta a UVA de <i>P. aeruginosa</i>	48
4.1.1	Respuesta a dosis letales de UVA	48
4.1.2	Naturaleza oxidativa de los efectos letales de UVA en mutantes de QS....	51
4.1.3	Actividad de las enzimas catalasa y SOD de las cepas mutantes deficientes en QS	52

4.1.4	Respuesta de los mutantes de QS a dosis subletales de UVA.....	55
4.1.5	Inducción de QS por dosis subletales de UVA	57
4.2	Mecanismos adaptativos de protección a la radiación UVA en <i>P. aeruginosa</i>	58
4.2.1	Protección a dosis letales de UVA por pre-exposición a bajas dosis	58
4.2.2	Influencia del gen <i>relA</i> en la protección fotoinducida.....	60
4.2.3	Influencia del QS en la protección fotoinducida.....	63
4.2.4	Influencia de las catalasa KatA y KatB en la protección fotoinducida	65
4.2.5	Relación entre protección osmótica y protección a radiación UVA	67
5.	Discusión.....	72
6.	Conclusiones.....	83
7.	Bibliografía.....	85

Resumen