



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

TESIS

**“Participación del ORF PA4078 en la virulencia de
Pseudomonas aeruginosa PAO1”**

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:

Lic. CARLA ISABEL TENA FUENTES

Director de tesis:

Dr. JESÚS CAMPOS GARCÍA

MORELIA, MICHOACÁN., SEPTIEMBRE 2023

El presente proyecto de tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología Microbiana perteneciente al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección del Dr. Jesús Campos García. Con apoyo del Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT).



AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todo el equipo de trabajo del laboratorio de Biotecnología Microbiana. A todos aquellos que me enseñaron lo más básico cuando primero llegué al laboratorio, a todos los que han formado parte de él y en especial a los miembros actuales. Ha sido un honor y un gusto trabajar y aprender con ustedes, espero haberles aportado algo yo también. Los días de trabajo en el lab fueron increíbles gracias a las buenas vibras, compañerismo, amistad y ambiente que entre todos hicimos. Un agradecimiento especial a Alma y Lore, por su paciencia y guía constante en el laboratorio. Y no menos importante agradecer al Dr. Jesús Campos por aceptarme en el laboratorio, por guiarme en esta etapa de mi formación académica y por la sabiduría científica y de vida que me compartió.

Gracias a todos los miembros de mi comité sinodal por todas sus observaciones, comentarios y aportaciones a este proyecto de tesis y a mi formación como maestra en ciencias.

Gracias a mi familia. A mi hermano que a pesar de a veces tener nuestras diferencias siempre está para mí cuando lo necesito. Gracias a las personas más importantes en mi vida, mis papás Isabel y Carlos. No está de más decir que todo lo que tengo es gracias a ustedes y este logro académico es un reflejo de todos los sacrificios que han hecho en su vida por mí. Al ser ustedes biólogos me entendieron y apoyaron más que nunca en este proceso y no serán suficientes palabras para agradecer por todo, espero que mi buen desempeño académico y profesional en un futuro aporte un poco a ese agradecimiento y amor que les tengo.

Gracias a todos mis amigos dentro y fuera de la universidad, por siempre apoyarme en la decisión de hacer una maestría, entender que muchas veces tenía trabajo en horas y días poco convencionales, preguntarme sobre mi proyecto aunque no entendieran nada, distraerme cuando estaba frustrada con mi trabajo, sacarme una sonrisa y preocuparse por mí en tiempos de tutorial. A mis amigos de la universidad/maestría, amigas de la prepa y amigas de baile, los quiero mucho a todos.

Gracias a Nef, creo que tú más que nadie sabe todo el trabajo detrás de este proyecto y siempre estuviste para apoyarme. Gracias por creer en mí cuando yo no lo hice, por darme palabras de aliento y no dejar que mis errores y fracasos me consumieran, siempre estuviste desde un lugar lleno de amor. Gracias por la crítica constructiva desde un punto de vista como biotecnólogo y colega científico, a pesar de muchas veces no entendernos por las diferencias en las áreas de las ciencias biológicas que nos gustan. Gracias por acompañarme y ser la persona que estuvo en momentos claves de la maestría y de mi vida, espero ser yo también esa persona para ti.

Gracias a mi amiga, compañera y otra neurona Xime, sin ti no se habría logrado la tesis ni la maestría. Gracias por hacer todo más divertido, estar siempre en las buenas, en las malas y para discutir nuestras ideas más esquizofrénicas.

A mi abuelito Aureliano

“Maybe I made a mistake yesterday, but yesterday’s me is still me. I am who I am today, with all my faults. Tomorrow I might be a tiny bit wiser, and that’s me, too. These faults and mistakes are what I am, making up the brightest stars in the constellation of my life.”

- Kim Namjoon

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.2. Factores de virulencia.....	12
1.2.1. Lipopolisacáridos	13
1.2.2. Biopelículas.....	14
1.2.3. Sideróforos	15
1.2.4. Piocianina.....	17
1.2.5. Ramnolípidos	18
1.2.6. Proteasas.....	20
1.3. Quorum sensing.....	21
1.3.1. Sistemas de Quorum sensing en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
1.4. Péptido sintetasa no ribosomales (NRPS)	26
1.4.1. Genes que codifican para NRPS en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
1.4.2. Ciclodipéptidos.....	30
2. ANTECEDENTES.....	33
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS.....	35
5. OBJETIVOS	36
5.1. Objetivo general	36
5.2. Objetivos específicos.....	36
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	37
7. MATERIALES Y MÉTODOS	39
7.1. Material biológico	39
7.2. Medios de cultivo	41
7.3. Métodos.....	42
7.3.1. Construcción de la mutante	42
7.3.2. Confirmación de la mutación	46
7.3.3. Clonación del ORF PA4078.....	47
7.3.4. Cuantificación y caracterización de ciclodipéptidos	47
7.3.5. Medición de los factores de virulencia.....	48

7.3.6	Patogenicidad en un modelo <i>in vivo</i>	50
7.3.7	Análisis estadístico.....	51
8.	RESULTADOS.....	52
8.1.	Construcción de la mutante PA4078::Gm por recombinación homóloga en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	52
8.2.	Caracterización de la mutante PA4078::Gm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.	56
8.3.	Clonación del ORF PA4078 en <i>Escherichia coli</i>	57
8.4.	Extracción, cuantificación y caracterización de ciclodipéptidos.....	58
8.5.	Efecto de la mutación en PA4078 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 sobre la producción de factores de virulencia.....	59
8.6.	Evaluación de la patogenicidad de la cepa PA4078::Gm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en <i>Caenorhabditis elegans</i>	62
9.	DISCUSIÓN	64
10.	PERSPECTIVAS	68
11.	CONCLUSIÓN	69
12.	BIBLIOGRAFÍA.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de los factores de virulencia producidos por <i>P. aeruginosa</i> en un proceso de infección.	12
Figura 2. Estructuras químicas de algunos sideróforos.	16
Figura 3. Estructura química de la piocianina.	18
Figura 4. Vía biosintética de los ramnolípidos en <i>P. aeruginosa</i>	19
Figura 5. Esquematización de la regulación y proceso de secreción de LasB en <i>P. aeruginosa</i>	20
Figura 6. Autoinductores, receptores y sintasas del Quorum sensing.	22
Figura 7. Mecanismo de acción de las enzimas AHL lactonasa y AHL acylasa.	23
Figura 8. Representación de las redes de señalización del Quorum sensing en <i>P. aeruginosa</i>	25
Figura 9. Organización de los módulos y dominios de la NRPS de surfactina.	27
Figura 10. Principio bioquímico de la síntesis de péptidos no ribosomales y la formación del enlace peptídico.	28
Figura 11. Mecanismo propuesto para la epimerización de los aminoácidos.	28
Figura 12. Esquematización de los locus en el genoma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 de los genes NRPS.	30
Figura 13. Interacción de los CDPs producidos por las NRPS de <i>P. aeruginosa</i> con los sistemas de Quorum sensing.	31
Figura 14. Electroforesis del fragmento interno de PA4078.	52
Figura 15. Clonación del fragmento interno en pGEM-T Easy.	53
Figura 16. Obtención del cassette de resistencia a gentamicina.	53
Figura 17. Interrupción del fragmento PA4078 con el cassette de Gm ^R	54
Figura 18. Sub-clonación del fragmento interrumpido en el plásmido pKOK4.	55
Figura 19. Conjugación tripartita.	55
Figura 20. Caracterización de la mutante por medio de PCR.	56
Figura 21. Imagen representativa del ensayo de crecimiento bacteriano en citrónelol.	57
Figura 22. Electroforesis de geles de agarosa mostrando el ORF PA4078 completo.	58
Figura 23. Cromatograma representativo del análisis en HPLC de los extractos de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y PA4078::Gm.	59
Figura 24. Gráfica de la abundancia de ciclodipéptidos extraídos de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> en PAO1 y PA4078.	59

Figura 25. Cuantificación de biopelículas, lipopolisacáridos y ramnolípidos en las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	60
Figura 26. Determinación de enzimas en el sobrenadante de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y PA4078::Gm.	61
Figura 27. Cuantificación de sideróforos en el sobrenadante de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y PA4078::Gm.	62
Figura 28. Cuantificación de piocianina de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y PA4078::Gm.	62
Figura 29. Curva de supervivencia de <i>C. elegans</i> tratados con sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1, JM2 y PA4078::Gm.	63
Figura 30. Curva de supervivencia de <i>C. elegans</i> tratados con cultivos de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1, JM2 y PA4078::Gm.	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resultados de la alineación de aminoácidos en el genoma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	29
Tabla 2. Organismos empleados	39
Tabla 3. Plásmidos	40
Tabla 4. Oligonucleótidos	40
Tabla 5. Enzimas y antibióticos	40

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista responsable de múltiples enfermedades en personas inmunocomprometidas, representando un grave problema de salud. El nivel de patogenicidad de las cepas de *P. aeruginosa* está relacionado a la producción de factores de virulencia. Las péptido sintetetas no ribosomales (NRPS) intervienen en la producción de algunos factores de virulencia microbianos, como la síntesis de piocianina. Recientemente se ha propuesto que las NRPS tienen un papel en la virulencia a través de la regulación del sistema de Quorum Sensing con moléculas pequeñas como los ciclodipéptidos (CDPs). Las NRPS han sido poco estudiadas desde el punto de vista de patogénesis bacteriana, por lo que es de interés caracterizar la función de genes asociados a la producción de factores de virulencia como los producidos por las NRPS. En este trabajo se estudió el ORF PA4078 cuya función es desconocida y se determinó su papel en la virulencia de la bacteria de *P. aeruginosa*. Se obtuvo una mutante del ORF PA4078 mediante interrupción génica por inserción de un cassette de resistencia a gentamicina y recombinación homóloga. A las clonas obtenidas se les determinó la producción de CDPs y varios factores de virulencia, posteriormente se evaluó su patogenicidad en un modelo *in vivo* de *Caenorhabditis elegans*. Se identificaron tres CDPs en el sobrenadante de las cepas: ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe); sin embargo, en la mutante PA4078::Gm no hubo diferencias significativas en la producción de éstos con respecto a la cepa silvestre PAO1. La mutante PA4078::Gm tuvo una mayor producción de biopelículas, ramnolípidos, lipopolisacáridos, elastasa y pioquelina en comparación a PAO1. Por otro lado, la producción de piocianina disminuyó en la mutante; pero la producción de proteasa y pioverdina no tuvo diferencia significativa comparando con la cepa PAO1. Estos resultados se vieron reflejados en el ensayo *in vivo* con *C. elegans*. En los ensayos con cultivo bacteriano, la mutante PA4078::Gm mostró una mayor virulencia desde las 12 h de tratamiento con respecto a la cepa silvestre PAO1. En los ensayos donde se utilizó solamente el sobrenadante del cultivo bacteriano se observó que la mutante fue más virulenta; sin embargo, se observó un mayor porcentaje de supervivencia de los nematodos en comparación al tratamiento con cultivo. Los resultados obtenidos indican que las NRPS de *P. aeruginosa* modifican indirectamente la producción de factores de virulencia e influyen el grado de patogénesis de la bacteria.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, NRPS, mutagénesis, virulencia, patogénesis.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen responsible for multiple diseases in immunocompromised people, representing a severe health problem. The level of pathogenicity of *P. aeruginosa* isolates is related to the production of virulence factors. Non-ribosomal peptide synthetases (NRPS) produce some microbial virulence factors, such as pyocyanin. It has recently been proposed that NRPSs play a role in bacterial virulence through the Quorum Sensing regulation system under the effect of small molecules such as acyl-homoserine lactones and cyclodipeptides (CDPs). NRPS have not been widely studied from the point of view of bacterial pathogenesis, being enjoyable to characterize the function of genes associated with the production of virulence factors such as those produced by NRPS. In this work, the ORF PA4078, whose function is unknown, was studied, and its role in the virulence of the *P. aeruginosa* PAO1 strain was determined. A mutant in the ORF PA4078 was obtained by gene disruption using a gentamicin resistance cassette and homologous recombination. To the clones obtained was determined the production of CDPs and several virulence factors; subsequently, evaluated in an *in vivo* model of *Caenorhabditis elegans* worms their pathogenicity. Three CDPs were identified in the supernatant of the mutant strains: cyclo(L-Pro-L-Tyr), cyclo(L-Pro-L-Val), and cyclo(L-Pro-L-Phe); however, there were no significant differences in their production between PA4078::Gm and PAO1. The PA4078::Gm mutant had a higher biofilm production, rhamnolipids, lipopolysaccharides, elastase, and pyochelin than the PAO1 wild-type strain. On the other hand, the PA4078::Gm mutant diminished pyocyanin production, but the production of protease and pyoverdine had no significant difference with the PAO1 strain. These results are reflected in the *in vivo* test with *C. elegans*. In assays with bacterial culture, the PA4078::Gm mutant showed greater virulence than PAO1 strain after 12 h of treatment. In the trials with supernatants, the same behavior was observed, the mutant being the most virulent, but a higher percentage of survival of the nematodes was obtained in all the strains in comparison to the treatment with bacterial cultures. The results indicate that the NRPSs are associated with virulence factors production and influence the pathogenesis of the *P. aeruginosa* PAO1 strain.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, NRPS, mutagenesis, virulence, pathogenesis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa ambiental ubicua. Es un patógeno humano nosocomial y oportunista capaz de causar una amplia gama de infecciones agudas y crónicas. Es un patógeno con una alta tasa de mortalidad, particularmente en pacientes con sistema inmune comprometido. Esto último se debe a una serie de mecanismos de adaptación, supervivencia y resistencia a múltiples clases de antibióticos, y también a una mayor resistencia en entornos sanitarios. Las infecciones por aislados de *P. aeruginosa* son difíciles de erradicar poniendo en riesgo la vida de los individuos, siendo considerado en todo el mundo como una amenaza para la salud pública (Moradali *et al.*, 2017; Poole, 2011).

A lo largo de los años, *P. aeruginosa* ha servido de paradigma para el estudio de la expresión, el metabolismo y la patogenia de genes bacterianos. Durante la evolución microbiana, la competencia entre procariotas y la adquisición de mecanismos para defenderse de los depredadores eucariotas han permitido el mantenimiento de marcadores de resistencia a los antibióticos, enzimas degradantes y sistemas de secreción, que repercuten en la infección humana (Frank, 2012).

Pseudomonas aeruginosa es intrínsecamente resistente a una variedad de antibióticos y puede desarrollar resistencia durante las terapias convencionales contra infecciones bacterianas, las cuales comprometen el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo. La resistencia adquirida en este organismo es multifactorial y atribuible a mutaciones cromosómicas y la adquisición de genes de resistencia a través de la transferencia horizontal de genes (Poole, 2011).

Los genomas de los aislados de *P. aeruginosa* son relativamente grandes (~ 5,5 a 7 Mpb). Su capacidad metabólica es amplia, como lo demuestra su capacidad para producir múltiples metabolitos secundarios, así como su capacidad para utilizar diversas fuentes de carbono y aceptores de electrones. La presencia ubicua de *P. aeruginosa*, así como su prevalencia y persistencia en entornos clínicos, se atribuyen a su extraordinaria capacidad de supervivencia mediante el reclutamiento de un arsenal de mecanismos de respuesta. La versatilidad metabólica la proporcionan los genes que codifican no solo las enzimas que participan en las vías metabólicas, sino también un número muy elevado de reguladores transcripcionales y sistemas reguladores de dos componentes (Klockgether *et al.*, 2011; Moradali *et al.*, 2017).

La divergencia en el tamaño del genoma es causada por el genoma accesorio. La mayor parte del genoma, el genoma central, se encuentra en todas las cepas de *P. aeruginosa*. El genoma accesorio consta de elementos extra-cromosómicos como los plásmidos y transposones, y de bloques de ADN insertados en el cromosoma en varios loci. Los elementos del genoma accesorio pueden estar presentes en subgrupos de la población de *P. aeruginosa*, pero también pueden aparecer en cepas o aislados individuales. Por lo tanto, un cromosoma de *P.*

aeruginosa se describe a menudo como una estructura en mosaico del genoma central interrumpido con frecuencia por secuencias insertadas correspondiendo al genoma accesorio (Klockgether *et al.*, 2011).

1.2. Factores de virulencia

La capacidad de una bacteria patógena para causar enfermedad depende de la producción de factores de virulencia, como toxinas y moléculas de adhesión, las cuales dañan los tejidos del hospedero. Tener como objetivo a los factores de virulencia (inhibir su producción o función) ha ganado interés como una posible estrategia antibacteriana. La versatilidad metabólica, resistencia intrínseca y adquirida a los antibióticos, formación de biopelículas y la producción de múltiples factores de virulencia hacen de *P. aeruginosa* un patógeno importante. La maquinaria de virulencia de *P. aeruginosa* comprende tanto determinantes asociados a la célula (lipopolisacáridos, pili y flagelos) como numerosos factores secretados: elastasas, proteasas, exotoxinas, piocianina (PCN) y polisacáridos extracelulares, entre otros (Fila *et al.*, 2017) Figura 1.

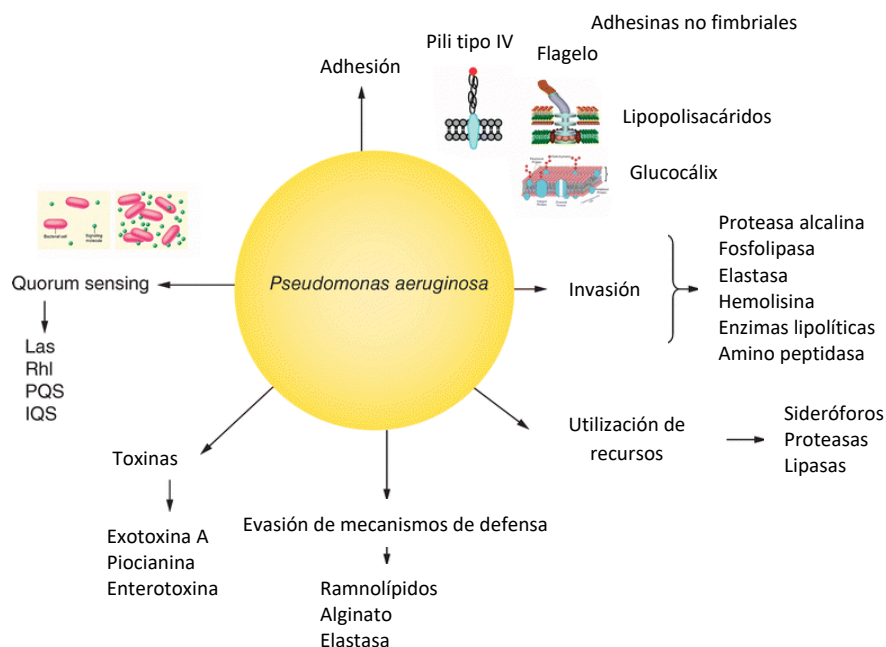


Figura 1. Representación de los factores de virulencia producidos por *P. aeruginosa* en un proceso de infección. Modificado de Veetilvalappil *et al.*, 2022.

Pseudomonas aeruginosa produce una variedad de factores de virulencia, en un sistema coordinado, que permite la colonización y adaptación del hospedero. Estos factores de virulencia incluyen la producción de biopelículas, piocianina, elastasa, ramnolípidos, etc., los cuales están bajo el control de la detección de quorum (*Quorum Sensing*; QS). El QS regula la producción de la mayoría de los factores de virulencia de *P. aeruginosa*, incluidos los

ramnolípidos, glicolípidos de bajo peso molecular, que están bajo la regulación directa del sistema RhlR-RhII (Ahmed *et al.*, 2019).

La patogenicidad de *P. aeruginosa* está fuertemente asociada con su capacidad para moverse. Otro factor importante que contribuye a su virulencia es el PCN (1-hidroxi-5-metilfenazina), un pigmento citotóxico secretado por la bacteria. Además, la virulencia se ve aumentada por factores secretados que permiten que la bacteria destruya el tejido del hospedero, module el sistema inmunológico, produzca biopelículas e inicie el proceso de colonización. Las elastasas LasA (estafilolisina) y LasB (pseudolisina) son proteasas secretadas por *P. aeruginosa*. La proteasa IV es una serina-proteasa de *Pseudomonas* que se ha demostrado que destruye los componentes del sistema inmunológico, así como el fibrinógeno, la plasmina y el plasminógeno. Por último, los factores de virulencia de *P. aeruginosa* incluyen hemolisinas, que lisan los glóbulos rojos y liberan hierro del grupo hemo, lo que permite que las bacterias crezcan rápidamente y conduzcan a una mayor colonización del tejido del huésped (Fila *et al.*, 2017).

1.2.1. Lipopolisacáridos

Los lipopolisacáridos (LPS) son un componente importante de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y desempeña un papel esencial en la interacción entre el sistema inmunitario innato del hospedero y el patógeno. Los TLR2 y TLR4 presentes en las superficies de los macrófagos se unen a los LPS de membrana de *P. aeruginosa* utilizando MyD88 y TICAM-1 como proteínas adaptadoras para inducir una respuesta inflamatoria (Wang *et al.*, 2021).

La molécula de LPS clásica está compuesta por tres dominios: una región central, el antígeno O/polisacárido O (OPS) y el lípido A, y se producen varias glico-formas que contribuyen a su virulencia. Los LPS estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y mucina formadora de gel en las células epiteliales de las vías respiratorias, lo que se asocia con la morbilidad y mortalidad de los pacientes con asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis quística (FQ). Aumenta la permeabilidad para-celular epitelial de las vías respiratorias e induce la inflamación pulmonar al estimular el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), la interleucina (IL)-1, la IL-6 y el interferón (IFN)- γ . También contribuye a la resistencia a los antibióticos e influye en la formación de vesículas de membrana externa (OMV) y biopelículas (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021).

El lípido A es un glicolípido hidrofóbico que ancla los otros dos restos de LPS en la membrana exterior y media la endotoxicidad. Una estructura básica de lípido A consiste en un esqueleto de bisfosfato de diglucosamina acilado en N y O [4-P- β -d-GlcpNII-(1 $\rightarrow$ 6)- α -d-GlcpNI-(1 $\rightarrow$ P)] y presenta variaciones químicas en el número de grupos acilo primarios y los tipos de ácidos grasos que sustituyen a los grupos acilo. Las cadenas de acilo del lípido A se unen al receptor MD2 de la célula huésped, activando la vía de señalización del receptor

tipo toll (TLR)-4. Tanto las cadenas de acilo como los fosfatos del lípido A interactúan con una quinolona del sistema Pqs de QS cuando se exporta a la membrana externa, induciendo la curvatura de la membrana, lo que lleva a la formación de vesículas. Las mutantes defectuosas para la síntesis de lípido A no logran desarrollar biopelículas y exhiben una unión bacteriana significativamente menor a las células epiteliales de las vías respiratorias, lo que sugiere que los LPS puede desempeñar un papel indirecto en la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

El polisacárido O es una cadena larga periférica altamente variable e inmunogénica de polisacáridos repetitivos que pueden ser lineales o ramificados. Existen dos formas de LPS en la superficie bacteriana: cubiertas o lisas y sin tapar o ásperas, cuando el OPS está presente o ausente, respectivamente. Además, simultáneamente se producen dos antígenos O: el antígeno polisacárido común (CPA o banda A), consta de unidades repetitivas de trisacárido d-ramnosa; el antígeno específico O (OSA o banda B), un heteropolímero que varía entre cepas bacterianas, siendo involucrado en muchas interacciones entre el huésped y el patógeno. Las células que no producen CPA no logran producir biopelículas estable y exhiben cambios en la morfología celular y la producción de la matriz del biopelículas (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* adaptadas al laboratorio sintetizan un LPS penta-acilado (75% de las moléculas), adicional al LPS hexa-acilado (25% de las moléculas). La diferencia entre las dos isoformas es la falta de un grupo de ácido 3-hidroxi-decanóico unido a oxígeno [10:0 (3-OH)] en la posición 3 de la primera glucosamina en la isoforma penta-acilada. En comparación con las bacterias planctónicas, el perfil de LPS de una cepa clínica de *P. aeruginosa* formadora de biopelículas muestra una pérdida casi completa del antígeno O, y el lípido A de penta-acil presenta un contenido 12:0 (2-OH) más bajo. La cepa de *P. aeruginosa* PAO1 muestra el mismo patrón de LPS que el del cultivo planctónico, el hexa- y hepta-acil lípido A de PAO1 contiene 10:0 (3-OH) en las posiciones C3 y C3' (Wang *et al.*, 2021).

1.2.2. Biopelículas

P. aeruginosa es un organismo modelo para el estudio de biopelículas. Las células bacterianas que crecen como biopelículas muestran muchas propiedades que difieren de las células planctónicas; tales como una mayor resistencia a los antibióticos, dificultando el tratamiento de cualquier infección y también pueden actuar contra el sistema inmunológico del hospedero. Esto conduce al establecimiento de infecciones crónicas altamente recalcitrantes que son un problema médico importante ya que *P. aeruginosa* puede existir tanto en forma de biopelículas como planctónica (Azam & Khan, 2019).

Más del 50% de la matriz extracelular de *P. aeruginosa* está formada por tres exopolisacáridos (EPS): el alginato de polisacárido capsular y dos polisacáridos agregativos

(Psl y Pel), pero también contiene lípidos, proteínas, ácidos nucleicos (ADN extracelular/eADN y ARN) y biosurfactantes, que contribuyen con la adherencia inicial de las células y proporcionan estructura a las biopelículas. Las células de *P. aeruginosa* producen esta matriz cuando las células muestran un alto grado de auto agregación durante las últimas etapas del desarrollo de biopelículas. Las biopelículas maduros de *P. aeruginosa* se caracterizan por estructuras en forma de hongo "coronadas" y una red compleja de canales que distribuyen nutrientes y oxígeno por los que eliminan los productos de desecho (Azam & Khan, 2019; Jurado-Martín *et al.*, 2021).

La producción de biopelículas es multifactorial, esta implica cuatro pasos principales: adhesión a una superficie (biótica o abiótica), multiplicación, formación de micro-colonias y maduración en una comunidad microbiana estructurada y resistente. La iniciación se produce con un aumento de c-di-GMP, un nucleótido de señalización (segundo mensajero bacteriano); es un regulador clave de la producción de adhesinas y exopolisacáridos (EPS). Regula el cambio de células bacterianas de móviles a estadios no móviles (sésiles) y de células adherentes en biopelículas. Cabe destacar que existen varias vías para la producción de biopelículas y que la expresión de genes que regulan las respuestas al estrés y la adaptación a entornos con limitaciones de oxígeno y hierro es vital para este proceso (Azam & Khan, 2019; Jurado-Martín *et al.*, 2021).

El alginato, también conocido como exopolisacárido mucoide (MEP), es el componente principal de las biopelículas de *P. aeruginosa*. Es un polímero aleatorio de alto peso molecular con proporciones variables de ácidos D-manurónico y L-gulurónico que están enlazados en β 1-4 y parcialmente O-acetilados. El operón *algD* codifica las enzimas necesarias para la síntesis de alginato, y su expresión está regulada por el factor σ (AlgT). Este exopolisacárido ayuda a la maduración, arquitectura y estabilidad de las biopelículas. El alginato se adhiere a la mucina traqueobronquial y actúa como adhesina. Los grupos acetilo contribuyen a su alta viscosidad, lo que permite la retención de agua y nutrientes. Contribuye a la persistencia bacteriana al proteger a *P. aeruginosa* contra la fagocitosis del hospedero en los pulmones y eliminar las ROS liberadas por los macrófagos y neutrófilos. Por último, puede unirse a los antibióticos aminoglucósidos, como la tobramicina, lo que dificulta su penetración en las biopelículas y por consiguiente se incrementa la resistencia a los antibióticos (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

1.2.3. Sideróforos

El hierro es un nutriente clave indispensable para la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos, ya que está involucrado en muchos procesos biológicos esenciales. El hierro es a menudo la fuente de competencia entre especies y es un factor limitante del crecimiento porque es poco soluble en soluciones acuosas en condiciones aeróbicas y a pH neutro y, en consecuencia, insuficientemente biodisponible. Los patógenos bacterianos se

enfrentan a un problema de disponibilidad de hierro en el hospedero, ya que se encuentra secuestrado en la molécula del grupo hemo o por proteínas circulantes como la transferrina o la lactoferrina (Cornelis & Dingemans, 2013; Perraud *et al.*, 2020).

En tal contexto de competencia por el hierro, las bacterias han desarrollado varias estrategias para acceder de manera eficiente a él, siendo la más común la producción y liberación de sideróforos (compuestos quelantes de hierro) a su entorno. Los sideróforos tienen pesos moleculares que oscilan entre 200 y 2000 Daltones (Da) y son producidos por las bacterias en condiciones limitantes de hierro. Los sideróforos se excretan en el entorno bacteriano donde capturan el hierro de manera muy eficiente antes de ser absorbidos por transportadores dependientes de TonB de la membrana externa altamente selectivos (TBDT). Las especies bacterianas generalmente producen uno o varios sideróforos y expresan un TBDT específico correspondiente para la recaptura del sideróforo una vez cargadas con hierro (Perraud *et al.*, 2020).

P. aeruginosa puede expresar diferentes vías y estrategias para la adquisición de hierro: una vía de absorción de hierro ferroso (Fe^{2+}), vías de adquisición de hemo, absorción de hierro férrico (Fe^{3+}) por los dos sideróforos principales, pioverdina (PVD) y pioquelina (PCH) y a través de la captación de xenosideróforos (no producidos por la propia bacteria). Según el tipo de infección que cause (aguda o crónica), *P. aeruginosa* puede adaptar su estrategia de absorción de hierro para satisfacer sus necesidades del metal sin gastar demasiada energía. Figura 2 (Cornelis & Dingemans, 2013; Perraud *et al.*, 2020).

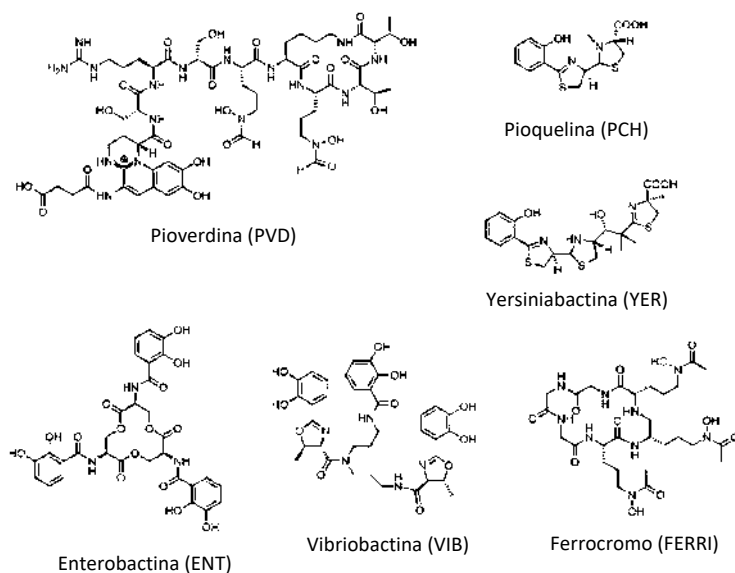


Figura 2. Estructuras químicas de algunos sideróforos. Modificado de Perraud *et al.*, 2020.

La pioverdina es un sideróforo compuesto (mixto) que comprende una cadena peptídica y un cromóforo. Las pioverdinas se producen cuando las bacterias se cultivan en condiciones limitantes de hierro. La parte cromófora conservada de la molécula proporciona la función

de catecolato que participa en la unión de Fe^{3+} , mientras que la cadena peptídica es muy variable entre las diferentes especies de *Pseudomonas* o incluso entre cepas. Las cadenas peptídicas de las pioverdinas contienen entre 6 y 12 aminoácidos. Las pioverdinas se unen al hierro con una afinidad muy alta, son capaces de desplazar el hierro de la transferrina y la producción de pioverdina es absolutamente necesaria para causar infección. La pioverdina no es solo un sideróforo, sino también una molécula de señal, ya que desencadena la producción de dos factores de virulencia, la proteasa PrpL y la exotoxina A. Aunque la pioverdina parece ser esencial para que *P. aeruginosa* cause infecciones agudas, también se ha demostrado que participa en el establecimiento de biopelículas estable (Cornelis & Dingemans, 2013).

La pioquelina tiene una menor afinidad por el hierro en comparación con la pioverdina. La pioquelina es un sideróforo fenólico que contiene dos anillos heterocíclicos que contienen azufre. La biosíntesis de pioquelina involucra un menor número de genes, y recientemente se ha demostrado que *P. aeruginosa* produce primero pioquelina y cambia a la producción de pioverdina solo cuando la concentración de hierro es realmente baja. La pioquelina-hierro puede realizar un ciclo redox y se ha demostrado que causa daño oxidativo e inflamación, especialmente en presencia de piocianina. En infecciones crónicas la producción de pioquelina podría desempeñar un papel en la respuesta inflamatoria sostenida (Cornelis & Dingemans, 2013).

1.2.4. Piocianina

Está bien documentado que *P. aeruginosa* produce varios factores de virulencia secretados conocidos como fenazinas. Uno de los más importantes es la piocianina, que es producida únicamente por *P. aeruginosa*. La piocianina se ha considerado anteriormente como un producto de desecho que no tiene una función biológica real. Sin embargo, la piocianina, en la última década, ganó un amplio reconocimiento como uno de los factores cruciales en el establecimiento de infecciones por *P. aeruginosa* (Alatraktchi *et al.*, 2020).

La piocianina (PCN) es una molécula redox activa, capaz de aceptar y donar electrones, lo que la hace ideal para la detección electroquímica (Alatraktchi *et al.*, 2020). Es un compuesto aromático que contiene nitrógeno, y que pertenece a la clase de compuestos de fenazina tricíclica, es un metabolito secundario responsable del color azul verdoso de las colonias de *P. aeruginosa* en cultivo. La PCN es un zwitterión que contiene un grupo fenol, lo que le confiere características ácidas débiles (pKa de 4.9). A pH fisiológico, la PCN existe en su estado neutro ionizado (azul) y en ambiente ácido está en su forma protonada y cargada (rojo). Se cree que el bajo peso molecular y las propiedades zwitteriónicas de la PCN permiten que la toxina penetre fácilmente en las membranas celulares. La PCN es secretada por *P. aeruginosa* en el medio por un sistema de secreción de tipo II T2SS. Figura 3 (Hall *et al.*, 2016).

Hasta la fecha, numerosos estudios han demostrado el potencial de la PCN en la virulencia y patogenicidad de las infecciones por pseudomonadaceas y sus posibles efectos tóxicos. La piocianina se asocia con la gravedad de la enfermedad y el deterioro de la función pulmonar debido a sus efectos proinflamatorios y de radicales libres. Puede aumentar las ROS y el H₂O₂ intracelulares, provocando estrés oxidativo y dañando el ciclo celular, enzimas y el ADN, lo que lleva a la lisis celular y muerte. En consecuencia, se libera eDNA, lo que probablemente contribuya a la formación de biopelículas y ayude a la persistencia de las infecciones. También se induce la liberación de ROS mitocondriales, lo que conduce a la

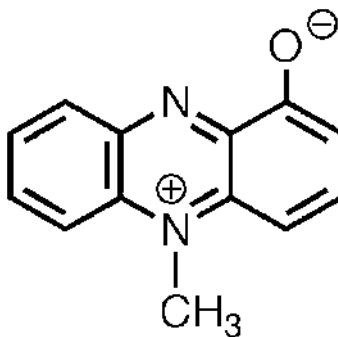


Figura 3. Estructura química de la piocianina.
Tomado de Hall *et al.*, 2016.

apoptosis de los neutrófilos. Además, causa disrupción epitelial y aumenta la secreción mucosa en el tracto respiratorio, lo que contribuye a la colonización pulmonar. Aumenta la producción de IL-8 por los macrófagos alveolares y la entrada de neutrófilos. Recientemente se ha reportado que la exposición a PCN conlleva consecuencias más amplias a las afecciones en el sistema respiratorio, tales como en el tracto urinario, el sistema cardiovascular y el sistema nervioso central (Hall *et al.*, 2016; Jurado-Martín *et al.*, 2021).

1.2.5. Ramnolípidos

Los ramnolípidos son glicolípidos que contienen fracciones de ácidos grasos l-ramnosa y β -hidroxilados. Existe evidencia de la participación de ramnolípidos en procesos fisiológicos, que incluyen la asimilación de sustratos insolubles, especialmente hidrocarburos, así como el cambio de la hidrofobicidad de la superficie celular; actividad antimicrobiana; actividad hemolítica en la patogénesis humana; solubilización de la señal de quinolona de *Pseudomonas* (PQS); promoción de la motilidad “swarming” (Reis *et al.*, 2011).

Los ramnolípidos son metabolitos secundarios extracelulares anfipáticos formados por una fracción de mono- o di-(L)-ramnosa (grupo hidrofílico) unida a través de un enlace O-glucosídico a un dímero de la cola de ácido graso β -hidroxilo (grupo hidrofóbico). Los ácidos grasos β -hidroxilo poseen diferentes longitudes de cadena de carbono y se han identificado más de 60 tipos de ramnolípidos en las diferentes cepas de *P. aeruginosa*. Las diferencias en

las estructuras de los ramnolípidos resultan en diferentes actividades de superficie/interfaz (Jurado-Martín *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2021).

P. aeruginosa produce dos tipos de ramnolípidos: mono-ramnolípidos, ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Rha-C10-C10) y el di-ramnolípidos, ramnosil-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Rha-Rha-C10-C10). La biosíntesis de ramnolípidos ocurre a través de tres reacciones secuenciales. RhlA cataliza la síntesis del resto de dímero de ácido graso de los ramnolípidos y el ácido 3-(3-hidroxi)alcanoil libre (HAA), mientras que las ramnosiltransferasas RhlB y RhlC catalizan la transferencia de dTDP-L-ramnosa a HAA o a un mono-ramnolípidos, respectivamente. Estudios recientes sugieren que RhlA es responsable de desviar el intermediario β -hidroxidecanoil-ACP del ciclo FASII (sistema de síntesis de ácidos grasos bacterianos), al competir directamente con FabA y FabI por este intermediario (Reis *et al.*, 2011) Figura 4.

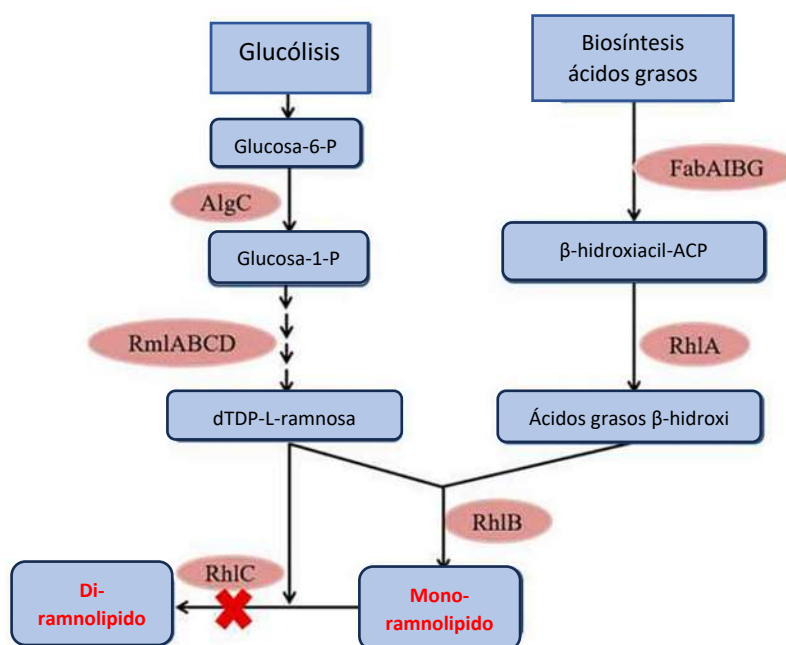


Figura 4. Vía biosintética de los ramnolípidos en *P. aeruginosa*.
Modificado de Zhao *et al.*, 2021.

Los ramnolípidos contribuyen significativamente a la patogénesis de *P. aeruginosa* en el pulmón, al disolver el surfactante pulmonar y alterar las uniones estrechas en el epitelio respiratorio. Las bajas concentraciones de ramnolípidos mejoran la liberación de LPS a la superficie celular, lo que aumenta la hidrofobicidad y la afinidad para la adherencia a una superficie. Contribuye a la arquitectura de las biopelículas al mantener abiertos los canales no colonizados. También facilitan la motilidad en ausencia de los pili tipo IV (T4P) y flagelos, y permiten la motilidad swarming al reducir la tensión superficial debido a sus propiedades surfactantes. Participan en la evasión inmunitaria para facilitar las infecciones crónicas al provocar la muerte necrótica de los leucocitos polimorfonucleares. Suprimen la

inmunidad innata del hospedero, previniendo una respuesta de β -defensina (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

1.2.6. Proteasas

Pseudomonas aeruginosa produce una amplia gama de factores proteicos de virulencia: citotoxinas (ExoA, ExoU, ExoS), elastasa LasA y LasB, proteasa alcalina (AprA), proteasa tipo IV, proteasa pequeña de *P. aeruginosa* (PASP), exoproteasa A grande (LepA), aminopeptidasa de *P. aeruginosa* (PAAP) y MucD (Iiyama *et al.*, 2017; Jurado-Martín *et al.*, 2021).

La proteasa alcalina AprA es una metaloproteasa dependiente de zinc y es uno de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* más estudiados. AprA corta varias proteínas, incluidas la laminina, el interferón- γ humano (IFN- γ), el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6). La laminina es un componente importante y biológicamente activo de la lámina basal. El IFN- γ es un factor clave en la inmunidad innata y adaptativa, mientras que el TNF- α y la IL-6 son importantes para la regulación de las células inmunitarias y la respuesta inmune del hospedero durante la infección. Además, AprA puede interferir con la quimiotaxis de los neutrófilos, lo que permite que las bacterias escapen de los fagocitos del sistema de defensa del huésped. AprA interfiere con la activación del complemento clásica y mediada por la vía de las lectinas a través del corte del componente proteico C2 (Iiyama *et al.*, 2017).

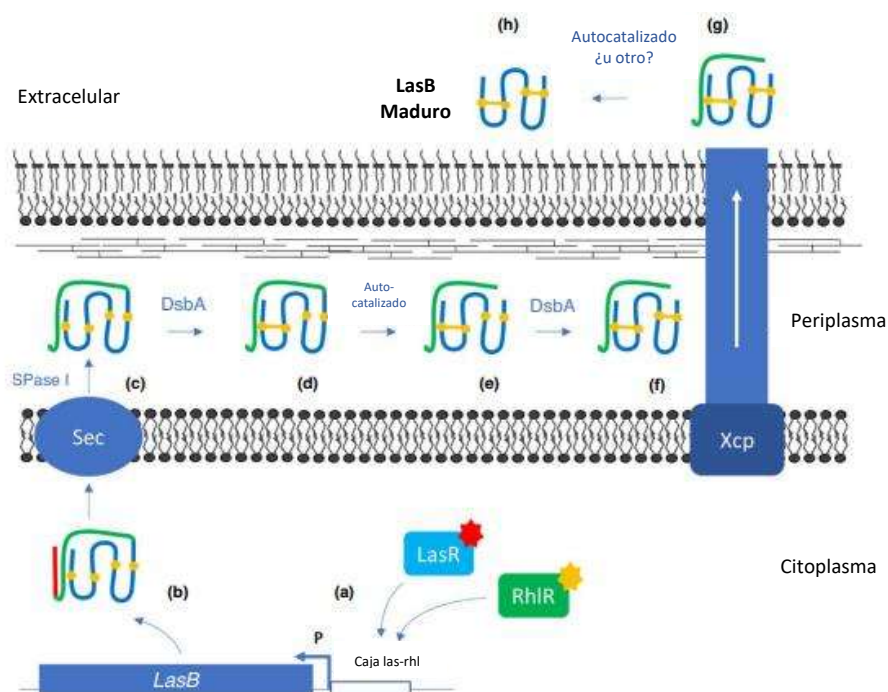


Figura 5. Esquemización de la regulación y proceso de secreción de LasB en *P. aeruginosa*. Modificado de Everett & Davies, 2021.

Las elastasas LasA y LasB son secretadas por el sistema de secreción tipo II (T2SS) bajo la regulación de los sistemas QS y degradan la elastina producida por el huésped (Jurado-Martín *et al.*, 2021). La proteína más abundante en el secretoma de *P. aeruginosa* es la elastasa B, también llamada LasB o pseudolisina, es una exoproteasa con actividad elastolítica. LasB se sintetiza como una preproelastasa con tres dominios peptídicos distintos. La regulación de la expresión de *lasB* está bajo el control del QS. El principal regulador de la expresión de *lasB* es la N-3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona (C12-HSL), sintetizado por la sintasa LasI. La expresión de la proteína LasI está bajo el control del regulador transcripcional LasR, creando así un circuito de retroalimentación de regulación positiva. Figura 5 (Everett & Davies, 2021).

LasB es una metaloproteasa neutra dependiente de Zn^{2+} con varios sitios de unión al calcio que se requieren para su estabilidad y actividad. Tiene una estructura terciaria similar a la termolisina pero con una hendidura de sitio activo más abierta con preferencia por aminoácidos hidrofóbicos. Se ha demostrado que LasB hidroliza una amplia gama de proteínas del huésped, causando daño a los tejidos, interrumpe la respuesta inmune y promueve la inflamación. LasB degrada muchos factores circulatorios/inmunes: inmunoglobulinas, citoquinas, quimioquinas, receptores, surfactantes, componentes del complemento, péptidos antimicrobianos e inhibidores de proteasas. Otro efecto es la inhibición de los procesos de reparación que siguen al daño tisular. Muchos componentes de la sangre del huésped son hidrolizados por LasB: transferrina y lactoferrina, que provocan la liberación de hierro y generan radicales libres citotóxicos; factores de coagulación fibrina, fibrinógeno y trombina, lo que provoca hemorragia y la generación de péptido C-terminal, que inhibe la respuesta inmune; hemoglobina, liberando el grupo hemo, lo que favorece el crecimiento bacteriano, a través de la adquisición de hierro, al mismo tiempo que causan daño del tejido del hospedero e induce inflamación (Everett & Davies, 2021).

Por otro lado, LasA o estafilolisina, es una serina proteasa codificada por el gen *lasA*, su nombre se debe a su capacidad para causar una lisis rápida de *S. aureus*, ya que rompe el puente de pentaglicina en el peptidoglicano. Aunque su actividad elastinolítica es limitada, puede potenciar esta acción en otras proteasas, incluida LasB, al romper los enlaces glicina-glicina dentro de la elastina. Recientemente, la expresión de LasA se correlacionó con la resistencia a los antibióticos en aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* (Jurado-Martín *et al.*, 2021).

1.3. Quorum sensing

El Quorum sensing (QS) es un proceso de comunicación de célula a célula que permite a las bacterias modificar colectivamente su comportamiento en respuesta a cambios en la densidad celular y la composición de especies de la comunidad microbiana circundante regulando la expresión génica. El QS coordina muchos procesos fisiológicos de las bacterias, como la

bioluminiscencia, la producción de factores de virulencia y metabolitos secundarios, la resistencia a estrés oxidativo, resistencia a antibióticos, motilidad y la formación de biopelículas (Defoirdt, 2018; Mukherjee & Bassler, 2019).

En muchos casos, las respuestas provocadas por las señales de QS son las que contribuyen directamente a la patogénesis de las bacterias, a través de la producción sincronizada de factores de virulencia, tales como toxinas, proteasas y otros factores inmunoelusivos. Además, el QS puede contribuir a comportamientos que les permitan resistir tratamientos con antibióticos, como la producción de biopelículas. Para algunas bacterias, trabajar juntas como grupo proporciona un medio para construir una defensa o superar una barrera que las células bacterianas individuales encuentran imposible de lograr, estos procesos son improductivos y costosos cuando los realiza una sola célula, pero se vuelven efectivos cuando los realiza el grupo (LaSarre & Federle, 2013; Papenfort & Bassler, 2016).

Todos los sistemas de QS implican la producción, liberación y detección de un grupo de moléculas pequeñas de señalización extracelular llamadas autoinductores (AI). Los AI se

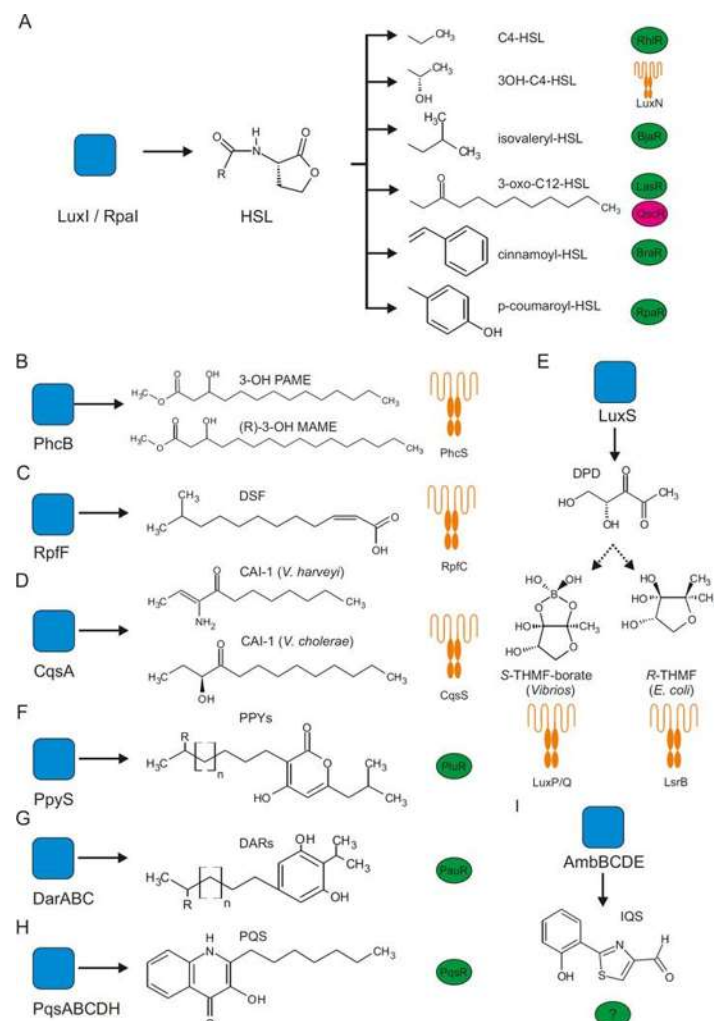


Figura 6. Autoinductores, receptores y sintetasas del Quorum sensing. Tomado de Papenfort & Bassler, 2016.

acumulan en el medio a medida que aumenta la densidad poblacional bacteriana. Las bacterias monitorean los cambios en la concentración de AI para alterar colectivamente los patrones de expresión génica. Los AI más estudiados pertenecen a una de estas categorías:

Acil-homoserina lactonas (AHL), utilizadas por bacterias Gram negativas (autoinductor-1 [AI-1]); señales peptídicas, utilizadas por bacterias Gram positivas; y autoinductor-2 (AI-2), utilizado por bacterias Gram negativas y positivas (*P. aeruginosa* no produce AI-2, sin embargo, puede detectar IA-2 producida por otras especies bacterianas y modificar su expresión génica). También hay otras señales de detección de quórum, como la señal de quinolona de *Pseudomonas* (PQS), el factor de señal difusible (DSF) y el autoinductor-3 (AI-3) Figura 6 (Abisado *et al.*, 2018; Papenfort & Bassler, 2016).

Las N-acil homoserina lactonas (AHL) son los AI más comunes utilizados por las bacterias Gram negativas. Estas moléculas están compuestas por un anillo invariante de homoserina-lactona (HSL) unido a una cadena de acilo que puede variar en longitud entre 4 y 18 carbonos (su longitud puede afectar la estabilidad y señalización). Las AHL pueden diferir en el estado de saturación de la cadena de acilo y el estado de oxidación. En términos generales, las AHL son biosintetizadas por miembros de la familia LuxI de AHL sintetas utilizando los sustratos S-adenosilmetionina (SAM) y una proteína portadora acilada (acil-ACP). Figura 7 (Defoirdt, 2018; LaSarre & Federle, 2013).

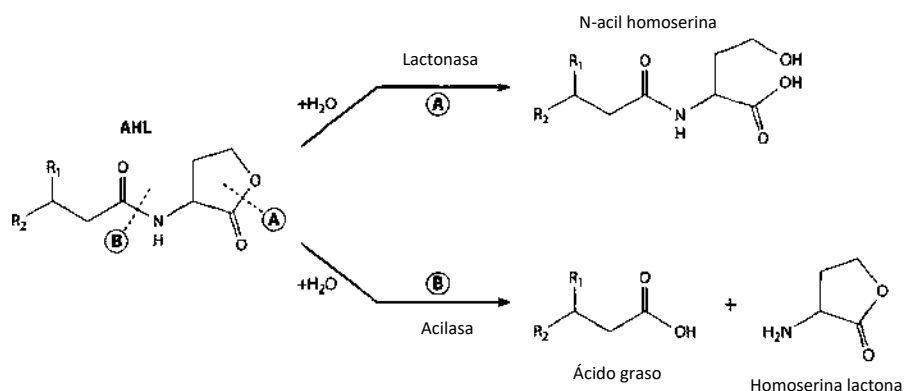


Figura 7. Mecanismo de acción de las enzimas AHL lactonasa y AHL acilasa. Modificado de LaSarre & Federle, 2013.

Una vez que se alcanza un umbral de concentración crítico, la interacción entre la AHL y una proteína receptora de tipo LuxR en el citoplasma de la célula se vuelve favorable. Los miembros de la familia LuxR son reguladores transcripcionales cuyas actividades de unión al ADN cambian con la interacción del ligando, lo que resulta en la modulación de la regulación del gen diana en respuesta a la acumulación de AHL. Cada receptor LuxR tiene un grado de especificidad de unión a AHL basada en la longitud, saturación y oxidación de la cadena de acilo del AHL (LaSarre & Federle, 2013). Las enzimas LuxI producen AHL derivando el residuo de lactona de S-Adenosil metionina (SAM) y la cadena de acilo a partir de intermediarios de la biosíntesis de ácidos grasos. Los receptores de tipo LuxR detectan las

AHL producidos por LuxI. Los LuxR forman homodímeros, y contienen dos dominios funcionales: un dominio de unión a ligando N-terminal y un dominio C-terminal hélice-giro-hélice de unión a ADN característico de muchos factores de transcripción bacterianos (Papenfort & Bassler, 2016).

1.3.1. Sistemas de Quorum sensing en *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa utiliza dos autoinductores AHL canónicos, y otros AI como: ciclodipéptidos (2,5- dicetopiperazinas; DKP) que son producidos por ciclodipéptido sintasas dependientes de ARNt, 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (IQS), y la señal de quinolonas de *P. aeruginosa* (PQS). PQS junto con las dos AHL, controla la formación de biopelículas y la producción de factores de virulencia. Las quinolonas son ampliamente conocidas por sus actividades antibióticas y anticancerígenas (Papenfort & Bassler, 2016).

Los principales receptores de QS de *P. aeruginosa* son los receptores de tipo LuxR. Actualmente existen cuatro vías de Quorum sensing bien conocidas en *P. aeruginosa*: dos sistemas de tipo LuxR y LuxI llamados *las* (conformado por LasR y LasI) y el sistema *rhl* (conformado por RhlR y RhlI). El sistema de quinolonas controlado por PqsR y el sistema IQS que funciona en condiciones limitantes de fosfato. Los sistemas *las* y *rhl* de QS dependen de N-(3-oxododecanoil)-L-homoserin lactona (3-oxo-C12-HSL) y N-butanoil-L-homoserin lactona (C4-HSL), respectivamente. Estos compuestos son sintetizados por las acil-L-homoserin lactona (AHL) sintasas, codificadas por los genes *lasI* y *rhlI*, respectivamente (Ahator & Zhang, 2019; González et al., 2017).

Uno de los sistemas de QS menos estudiado involucra la 2-heptil-3-hidroxi-4-(1H)-quinolona (PQS) y su precursor 2-heptil-4-(1H)-hidroxiquinolina (HHQ), estos son productos resultantes de las actividades enzimáticas codificadas en el grupo de genes *pqs*. Tanto PQS como HHQ actúan como autoinductores a través de su interacción con los factores transcripcionales PqsR, LasR y RhlR lo que da como resultado la modulación de la expresión del gen diana. La jerarquía de señalización, corriente arriba de los sistemas *pqs* y *rhl*, se define además por la molécula de señalización 2-(2- hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (IQS o aeruginaldehído), que es sintetizado por el grupo de genes *ambBCDE* y juega un papel importante en la patogénesis por la producción pioquelina (González et al., 2017; LaSarre & Federle, 2013).

La detección de quórum (QS) en *P. aeruginosa* es una red compleja compuesta por al menos tres pares de señal/receptor distintos que funcionan de manera jerárquica con LasR al inicio de la cascada de señalización. LasR, en complejo con 3-oxo-C12-HSL, activa un regulón de genes posteriores que incluye el gen *lasI* sintasa, que conduce a la autoinducción. LasR también activa la expresión de *rhlR* y *rhlI*, que codifican la vía de detección del segundo sistema de QS; y también activa a los genes *pqsR* y *pqsABCDH*, que codifican el sistema PQS. RhlR opera de manera similar a LasR, y cuando se une a C4-HSL, activa su propio

regulón que incluye *rhII* y, por lo tanto, establece el segundo ciclo de autoinducción. LasR y RhlR regulan positiva y negativamente la expresión de genes involucrados en el tercer sistema PQS. PQS autoinduce su propia producción mientras promueve la expresión de RhlR, por lo que autolimita su expresión a través de un ciclo de retroalimentación negativa. El complejo PqsR-PQS retroalimenta para activar *rhIR*, que conecta los tres sistemas de señalización. Además, RhlR inhibe la expresión de *pqsR* y *pqsABCD* para asegurar la proporción correcta de 3-oxo-C12-HSL a C4-HSL, que, a su vez, dicta la activación de PQS. Cada sistema de QS también regula varios genes que codifican factores de virulencia. Estos ajustes de la respuesta a través de varias capas de regulación permiten una comunicación sólida entre células en diversas condiciones. Figura 8 (Ahator & Zhang, 2019; Lee & Zhang, 2015).

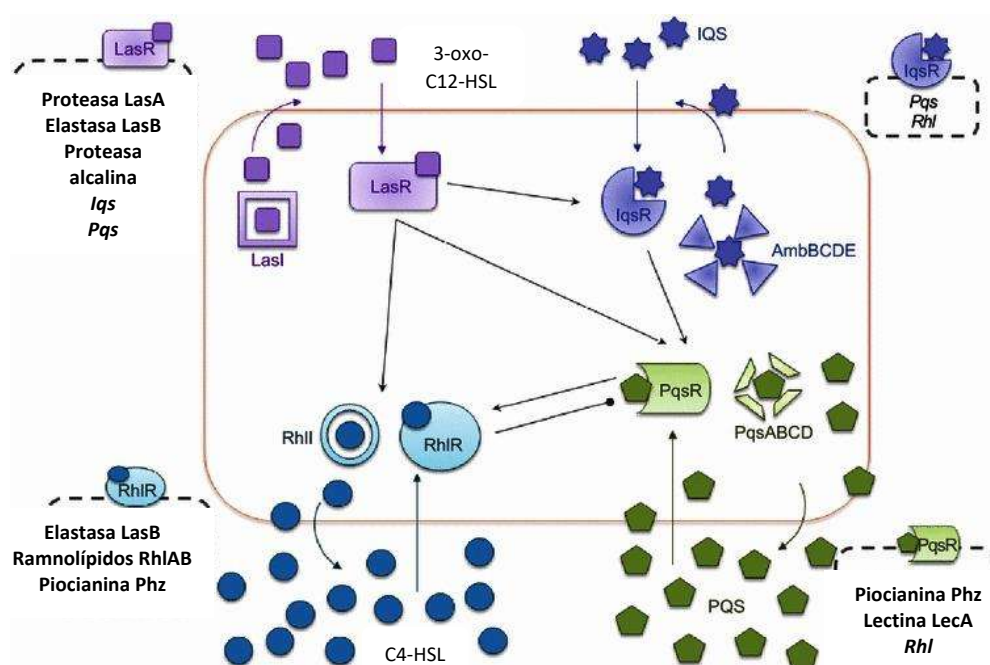


Figura 8. Representación de las cuatro redes de señalización del Quorum sensing en *P. aeruginosa*. Modificado de Lee & Zhang, 2015.

El cuarto sistema de QS en *P. aeruginosa* corresponde al sistema IQS, el cual fue descubierto después de haber estudiado los tres primeros sistemas. Utiliza una molécula diferente como autoinductor, la cual es 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído (IQS). Este sistema se activa en situaciones en las que hay limitante de fósforo en el ambiente, y es una estrategia que le permite a la bacteria seguir produciendo factores de virulencia en ambientes hostiles, sobre todo al establecer una infección en el hospedero. Además, el sistema IQS puede sustituir al sistema *las* como el activador de los otros sistemas de QS cascada arriba. El operón *ambABCDE* tiene un papel controversial en este sistema ya que algunos autores lo clasifican como productor de IQS, mientras que otros autores mencionan que este operón no tiene relación y que IQS es un derivado de la ruta de síntesis de la pioquelina (Cornelis, 2019; Lee *et al.*, 2013).

RhlR es un componente clave del Quorum sensing en *P. aeruginosa*, ya que controla la expresión de genes de virulencia; como *rhlI* puede ser activado por LasR o PqsR, junto con RhlR unido a C4- HSL, se requiere al menos otro autoinductor para la patogenicidad. Se ha observado que en cepas de *P. aeruginosa* ambientales, el autoinductor adicional requerido generalmente lo suministra el sistema *las* (Huang *et al.*, 2020).

1.4. Péptido sintetasa no ribosomales (NRPS)

Muchos productos naturales con actividad biológica son metabolitos secundarios producidos por varias especies bacterianas y fúngicas, que desempeñan funciones importantes en el crecimiento, señalización celular, adquisición de nutrientes, comunicación intra e interespecie y la virulencia. Estos metabolitos pueden ser producidos por péptido sintetasa no ribosomales (NRPS por sus siglas en inglés); éstas son enzimas de gran tamaño, multifuncionales y modulares multi-dominio que funcionan en una línea de ensamblaje condensando aminoácidos simples en moléculas complejas. El impacto de los metabolitos de péptidos no ribosomales en la calidad de vida humana y su actividad farmacéutica despertó el interés de las industrias para invertir en la identificación, ingeniería y estudio de sus vías biosintéticas, ya que son una fuente de diversos productos para producir compuestos novedosos como antibióticos, inmunosupresores, toxinas de plantas y animales, e inhibidores de enzimas (Ali *et al.*, 2014; Gulick, 2017).

Los NRPS tienen una organización modular. Generalmente, cada módulo contiene los dominios catalíticos que son responsables de la incorporación de un solo aminoácido (alargamiento de la cadena) en el producto peptídico. Cada módulo puede subdividirse en dominios que contienen toda la información esencial para el reconocimiento, activación y modificación del sustrato correspondiente, es decir, catalizan reacciones bioquímicas específicas (Izoré *et al.*, 2021).

Un módulo de una NRPS estándar consta de: un **dominio de tiolación** (8 kDa), también conocido como proteína transportadora de peptidilo (PCP), que se une al aminoácido activado. El dominio PCP contiene un residuo de serina conservado que se modifica postraduccionalmente con un cofactor de fosfopanteteína. Esta fosfopanteteína sirve como un conector flexible que alberga un tiol sobre el que se instalan los intermedios de aminoácidos y péptidos como un tioéster. Un **dominio de adenilación** (A) responsable de la activación de los aminoácidos, que cataliza una reacción de dos pasos para activar y luego cargar el aminoácido en el cofactor de panteteína. Un **dominio de condensación** (C) que cataliza la formación de enlaces peptídicos, es responsable de la extensión del péptido en crecimiento y, por lo tanto, es el verdadero dominio de péptido sintetasa. Figura 9 (Bonhomme *et al.*, 2021; Gulick, 2017).

El dominio de adenilación (A) de las NRPS reconoce un aminoácido o hidroxíácido específico y lo activa como un (amino) acil adenilato por hidrólisis de ATP. El grupo acilo

activado, forma entonces un enlace tioéster con el cofactor fosfopanteteína de un dominio PCP. En la reacción parcial inicial de formación de adenilato, el sustrato de aminoácido y el ATP reaccionan para formar un amino-acil-adenilato y pirofosfato. En un segundo paso, el

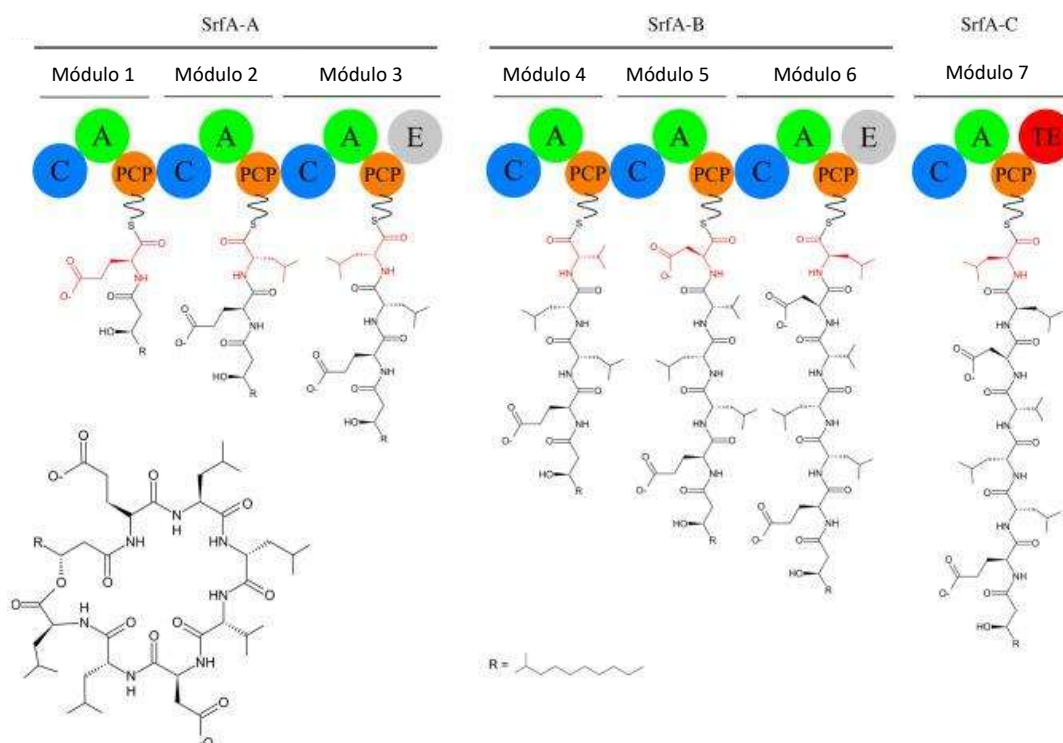


Figura 9. Organización de los módulos y dominios de la NRPS de surfactina, se observa la disposición de los dominios y la adición de aminoácidos. Modificado de Bonhomme *et al.*, 2021.

panteteína-tiol ataca el carbonilo del sustrato del aminoácido para desplazar el AMP, que sirve como un grupo saliente para esta reacción (Brown *et al.*, 2018; Gulick, 2017).

El sitio de unión de la fosfopanteteína: se une un grupo protésico de 4'-fosfopanteteína a través de una serina. Este grupo protésico actúa como un "brazo oscilante" para la unión de grupos de aminoácidos y ácidos grasos activados. Este dominio forma un paquete de cuatro hélices (Izoré *et al.*, 2021).

El mecanismo de reducción en el dominio PCP implica la activación del sustrato por adenilación y transferencia a un cofactor de panteteína unido covalentemente como un tioéster. Este tioéster luego se reduce para dar un aldehído (liberando así el producto) y un panteteína-tiol regenerado. Este dominio se encuentra invariablemente en el extremo C-terminal de las proteínas que lo contienen, presumiblemente porque da como resultado la liberación del producto (Bonhomme *et al.*, 2021).

Debido a que el péptido se une covalentemente a los dominios de PCP durante la síntesis, los NRPS requieren un dominio que catalice la liberación del péptido completo en solución. Más comúnmente, esta actividad reside en un dominio de tioesterasa C-terminal que contiene una serina catalítica, o menos comúnmente una cisteína, que forma un intermedio estable de acil-

enzima. Este intermedio puede resolverse luego mediante hidrólisis para liberar el péptido lineal, o mediante ciclación con la amina N-terminal. Figura 10 (Grünewald & Marahiel, 2006; Gulick, 2017).

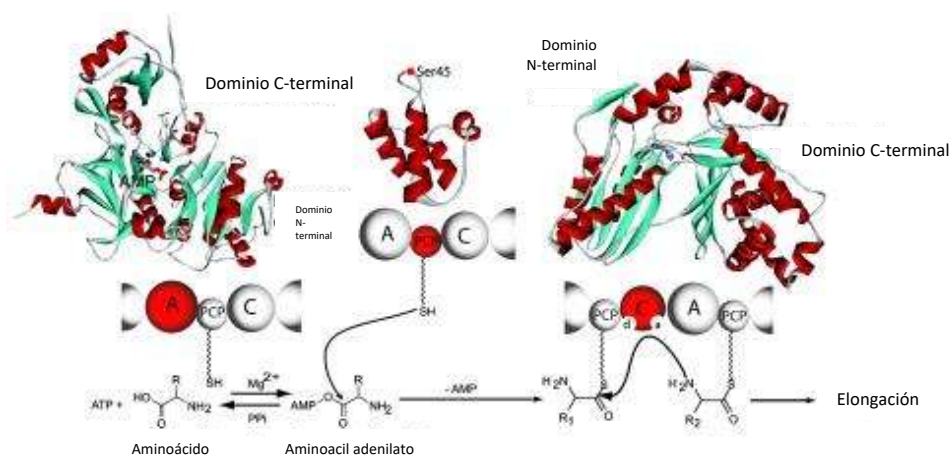


Figura 10. Principio bioquímico de la síntesis de péptidos no ribosomales y la formación del enlace peptídico. Modificado de Grünewald & Marahiel, 2006.

Se han encontrado variaciones adicionales como la ciclación a través de una cadena lateral nucleofílica presente en el péptido, como una lisina interna, un ejemplo es la pioverdina y los antibióticos tirocidina y bacitracina. La presencia del intermedio acil-enzima también permite la oligomerización del producto peptídico en ciertos casos en los que un péptido que ha sido completado a través de un ciclo de síntesis por los módulos NRPS, puede servir como nucleófilo para atacar un segundo intermedio peptídico (Gulick, 2017).

El arreglo común de estos dominios siguen una organización (C-A-PCP)_n. Dos PCP de los módulos río arriba y río abajo se encuentran en el sitio activo del dominio de condensación para permitir que el aminoácido o péptido río arriba se transfiera al aminoácido que se carga en el PCP río abajo. Además, existen variedades de dominios extras que catalizan modificaciones químicas adicionales para diversificar aún más la naturaleza de los productos peptídicos como son los metiltransferasa (MT), dominios de epimerización (E) y dominios que catalizan la heterociclización de residuos de serina, treonina y cisteína para formar anillos de oxazolina y tiazolina. Figura 11 (Brown *et al.*, 2018; Grünewald & Marahiel, 2006).

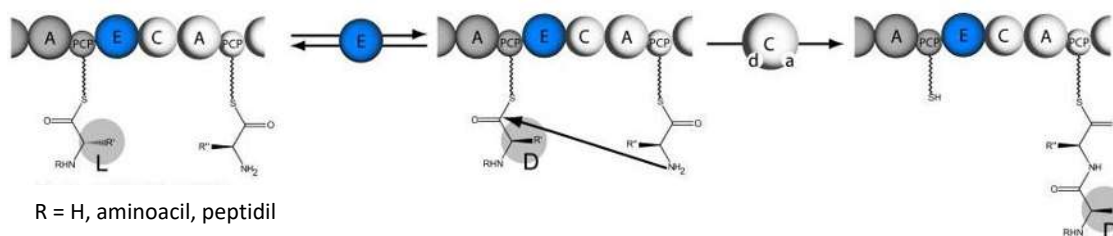


Figura 11. Mecanismo propuesto para la epimerización de los aminoácidos. Modificado de Grünewald & Marahiel, 2006.

El número de módulos y la organización de los dominios dentro de las enzimas NRPS controla las estructuras del producto final. Por tanto, el orden de los módulos suele corresponder a la secuencia de aminoácidos del péptido. Muchos sistemas NRPS se adhieren a este paradigma mecanicista, que a menudo se denomina "regla de colinealidad" (Ali *et al.*, 2014).

1.4.1. Genes que codifican para NRPS en *Pseudomonas aeruginosa*

Los péptidos no ribosomales (NRP) son una familia diversa de productos naturales que pertenecen a la clase de metabolitos secundarios, y que presentan propiedades diversas como toxinas, sideróforos, pigmentos, antibióticos, citostáticos, inmunosupresores o agentes anticancerígenos. Tienen una particularidad: su síntesis es independiente de la maquinaria ribosómica. Estos péptidos tienen características estructurales tales como contener en su estructura aminoácidos tipo ornitina o iminoácidos, y sus estructuras pueden ser macrocíclicas, macrocíclicas ramificadas, dímeros o trímeros de elementos estructurales idénticos (Martínez-Núñez & López, 2016).

En el genoma de *P. aeruginosa* se han identificado varios genes que codifican para NRPS. Se identificaron a través de un análisis bioinformático de secuencia de aminoácidos con el algoritmo BLASTp, en los que se tomó como referencia AusA de *S. aureus* y LgrA from *B. brevis* NBRC 100599. De los resultados del alineamiento, se seleccionaron 10 secuencias que cumplieran con las características y fueron propuestas como péptido sintetasas no ribosomales. Tabla 1 (González *et al.*, 2017).

Tabla 1. Resultados de la alineación de aminoácidos en el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, muestra las secuencias propuestas como NRPS. Modificado de González *et al.*, 2017.

ORF	Descripción	% id	Dominios	# módulos	# aa
PA2302	AmbE, péptido sintetasa no ribosomal	24	A-MeT-T-C-TE	1	2124
PA2305	AmbB, péptido sintetasa no ribosomal	30	C-T-A	1	1249
PA2424	PvdL, sintetasa L Pioverdina	35	A-T-C-A-T-C-A-T-C-C-A-T	4	4342
PA2399	PvdD, sintetasa D Pioverdina	35	C-X-A-T-C-X-A-T-TE	2	2448
PA2400	PvdJ, sintetasa J Pioverdina	34	C-A-T-C-A-T	2	2157
PA2402	PvdI, sintetasa J Pioverdina	36	C-A-T-C-C-A-T-C-A-T-C-C-A-T	4	5149
PA3327	probable péptido sintetasa no ribosomal	31	C-A-T-C-A-T-TE	2	2352
PA4078	probable péptido sintetasa no ribosomal	32	A-T-NAD	1	991
PA4225	PchF, pioquelina sintetasa	26	C-A-T-TE	1	1809
PA4226	PchE, ácido dihidroaeruginoso sintetasa	26	T-C-A-T	1	1438

Algunos de los genes que fueron encontrados participan en rutas metabólicas que ya han sido descritas. Las proteínas PvdD (PA2399), PvdJ (PA2400-PA2401), PvdI (PA2402) y PvdL (PA2424) están involucradas en la síntesis de pioverdina. Estos genes se encuentran ubicados en dos operones diferentes pero adyacentes en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1. Otro grupo incluye a las proteínas AmbB (PA2305) y AmbE (PA2302), asociadas a la biosíntesis de

IQS, cuyos genes pertenecen al operón *ambABCDE*. Finalmente, se encontraron dos proteínas hipotéticas con funciones desconocidas, estas se encuentran codificados en los ORF PA3327 y PA4078. Las secuencias de PvdI y PvdL tienen un tamaño de 5000 aminoácidos y están compuestos por cuatro módulos; PvdD, PvdJ y PA3327 miden alrededor de 2000 aminoácidos y tienen dos módulos; y las proteínas más cortas son AmbE, AmbB, PchF, PchE y PA4078 con alrededor de 1000 aminoácidos y solo presentan un módulo. Figura 12 (González *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2019).

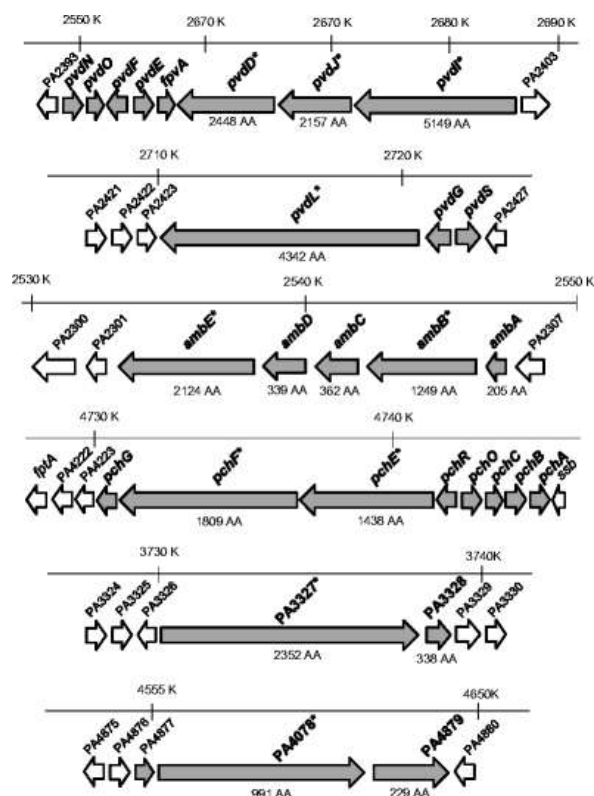


Figura 12. Esquematación de los loci en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 de los genes NRPS. Tomado de González *et al.*, 2017.

Otro examen exploró la existencia de CDP sintetas, enzimas dependientes de aa-tRNA, que son más pequeñas en comparación con las NRPS multimodulares. Se llevó a cabo el análisis con las secuencias de referencia AlbC de *Streptomyces noursei* y NozA y NcdA del actinomiceto *Nocardiosis sp.* CMB-M0232. Se identificaron posibles proteínas homólogas a CDPS dependientes de aa-tRNA, pero mostraron puntuaciones de identidad bajas y carecían de dominios críticos, lo que sugiere que el genoma de PAO1 carece de ciclodipeptido sintasa dependiente de aminoacil-tRNA (González *et al.*, 2017).

1.4.2. Ciclodipeptidos

Los ciclodipeptidos (CDPs) son moléculas cicladas que están formados por dos aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Son producidos por una amplia gama de organismos, desde

Staphylococcus aureus, los CDPs ciclo(L-Val-L-Tyr) y ciclo(L-Val-L-Phe) están implicados en la regulación de factores de virulencia bacteriana en un huésped murino. Existe evidencia de que los CDPs ciclo(L-Leu-L-Pro) y cis-ciclo(L-Phe-L-Pro) aislados de *Lactobacillus* muestran actividad anti-viral contra el virus de la influenza A (H3N2) (Hernández-Padilla *et al.*, 2017).

En células de mamíferos, los CDPs inducen daño al ADN a través de especies reactivas de oxígeno (ROS). El CDP ciclo(L-Phe-L-His) de *Aspergillus ustus* inhibe el ciclo celular en varias líneas celulares cancerosas, mientras que el ciclo(L-Phe-L-Pro) de *L. plantarum* induce apoptosis en las células HT-29 de cáncer de colon. Incluso los CDPs sintéticos como el ciclo(Phe-Pro) inducen apoptosis en la línea celular de cáncer de colon HT-29, y el ciclo(L-Cys-L-Leu) tiene el potencial de eliminar radicales libres. Los mecanismos moleculares detrás de la inducción de la muerte celular en líneas de células cancerosas por CDPs involucran procesos biológicos como la polimerización de microtúbulos. Otro mecanismo es el de ciclo(D-Tyr-D-Phe) aislado de *Bacillus sp.*, que induce apoptosis a través de la activación de la caspasa 3 en la línea celular de adenocarcinoma pulmonar A549. Además, se ha demostrado que una mezcla de CDPs obtenida de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa*, compuesta por ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe), promueve la muerte celular en células HeLa y Caco-2, por la vía apoptótica como mecanismo para la inhibición de la proliferación celular (Hernández-Padilla *et al.*, 2017).

2. ANTECEDENTES

La patogenicidad de *P. aeruginosa* se relaciona con la producción de un gran repertorio de factores de virulencia de diferente naturaleza bioquímica. Se ha reportado que los factores de virulencia asociados al sistema de QS participan en la colonización del hospedero, tales como elastasa, ramnolípidos, pioverdina, piocianina, etc. Además, la producción de biopelículas participa en la adhesión e infecciones crónicas, proceso que también está asociado al QS (Ben Haj Khalifa *et al.*, 2011). Se ha reportado que los sistemas *las/rhl* de *P. aeruginosa* son esenciales para la patogénesis de la bacteria y que pueden ser inactivados con moléculas pequeñas (anti-quorum). Un ejemplo es la meta-bromo-tiolactona, que es una molécula parecida a los autoinductores naturales de la bacteria. Esta molécula se une e inhibe parcialmente LasR y RhlR, resultando en una menor expresión de genes implicados en la producción de piocianina, no produce biopelículas y reduce la muerte de *C. elegans* y células epiteliales de pulmón, haciendo énfasis en que RhlR es el objetivo clave (O'Loughlin *et al.*, 2013). En el mismo contexto, la cepa marina ID4365 de *P. aeruginosa* posee una mutación natural en *lasR*, sin embargo, se observa una respuesta del QS con el sistema *rhl* produciendo varios factores de virulencia. Esta cepa produce ramnolípidos, sobre produce piocianina y es virulenta en un modelo murino. Una mutación en *rhlR* resultó en la nula producción de ramnolípidos, piocianina y elastasa (Cocotl-Yañez *et al.*, 2020).

Algunas de las moléculas que puede interaccionar con el QS son los péptidos de pequeño tamaño. En un estudio, sintetizaron dos péptidos basándose en estructuras de péptidos catiónicos producidos como defensa por varios hospederos (LIVRHK y LIVRRK) y evaluaron su efecto en la producción de factores de virulencia y biopelículas. Los Resultados arrojaron que estos péptidos inhibieron la formación de biopelículas y la producción de proteasa, ramnolípidos y piocianina sin afectar el crecimiento de *P. aeruginosa*. Además, con un ensayo transcripcional observaron una disminución en la expresión de *lasR*, *lasI*, *rhlR* y *rhlI* (Taha *et al.*, 2019). Otro ejemplo son los ciclodipéptidos que contienen triptófano que demostraron tener un efecto anti-QS. Los CDPs lograron reducir la producción de violaceína en un modelo bacteriano con *C. violaceum* CV026 para la detección de agentes anti-QS. Por otro lado, redujeron la producción de piocianina y elastasa, así como la formación de biopelículas y su adhesión a las superficies en *P. aeruginosa*. Así mismo, los CDPs mostraron muy poca citotoxicidad en células de mamíferos y glóbulos rojos (Wang *et al.*, 2022).

Una fuente importante de péptidos con actividad biológica son las NRPS, estas enzimas sintetizan péptidos sin necesidad de la maquinaria ribosomal. Anteriormente, se reportaron 10 genes de NRPS en el genoma de *P. aeruginosa* que están involucrados en la síntesis de varios ciclodipéptidos que pueden interactuar con el QS, por lo tanto, regulando la patogenicidad de la bacteria. Entre ellos se encuentra PA4078, que se define en la literatura como “posible NRPS” y del cual hay muy poca información (González *et al.*, 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que representa un problema a la salud humana. Se ha demostrado que los factores de virulencia están involucrados con la patogenicidad de *P. aeruginosa*. Así mismo, múltiples metabolitos secundarios, como aquellos producidos por las enzimas Péptido Sintetasa No Ribosomales (NRPS), juegan un papel importante en la regulación del sistema de Quorum sensing (QS), que a su vez está involucrado en la producción de algunos factores de virulencia y, en consecuencia, en la patogenicidad de la bacteria. Adicionalmente, es de interés científico caracterizar la función de genes que codifican a posibles NRPS en *P. aeruginosa*. En este proyecto se plantea estudiar el ORF PA4078, cuya función es desconocida, y determinar su implicación en la virulencia de la bacteria.

4. HIPÓTESIS

El marco de lectura abierto (ORF) PA4078 de *P. aeruginosa* PAO1 codifica para una probable péptido sintetasa no ribosomal implicada en la virulencia de la bacteria.

5. OBJETIVOS

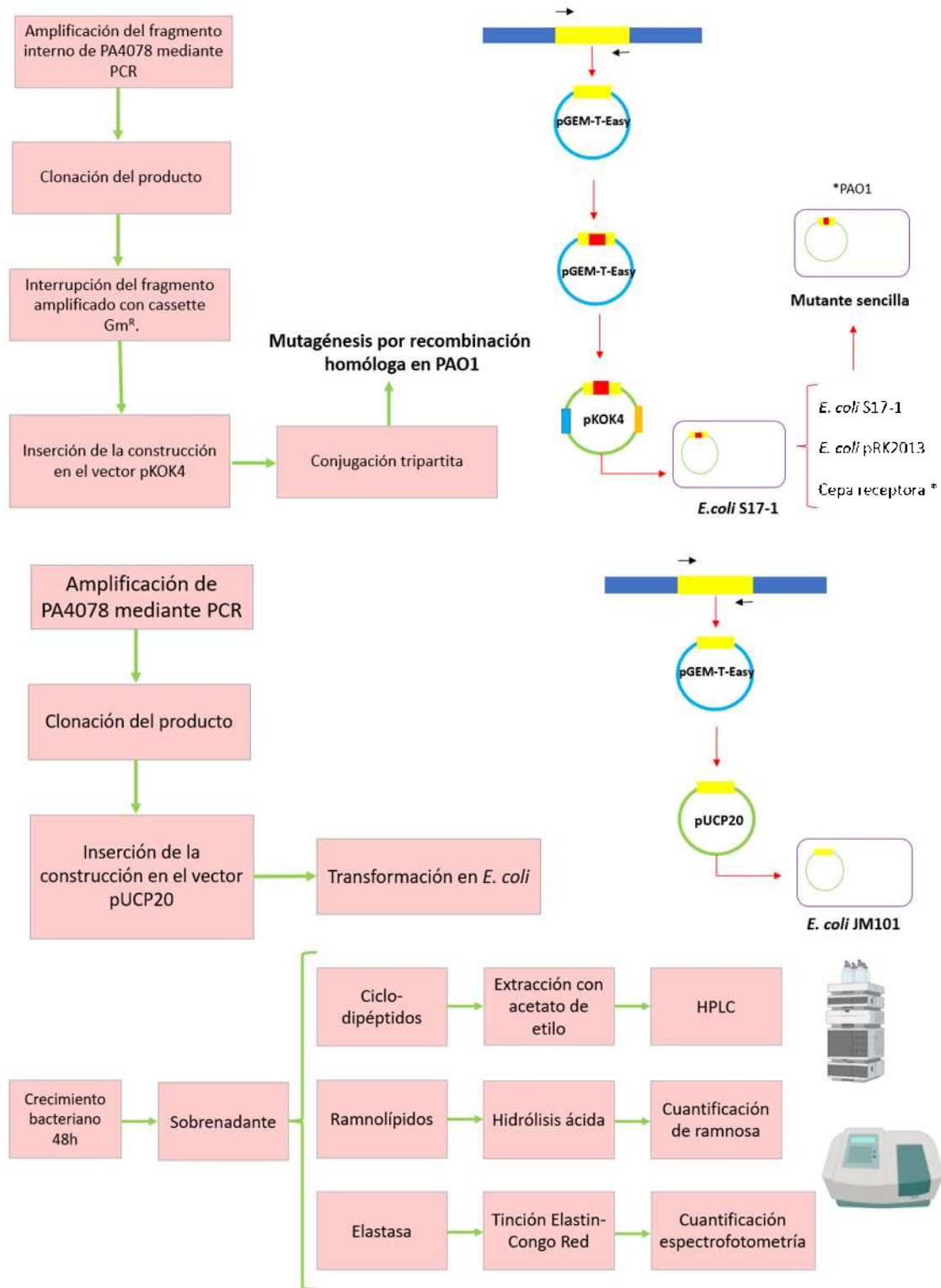
5.1. Objetivo general

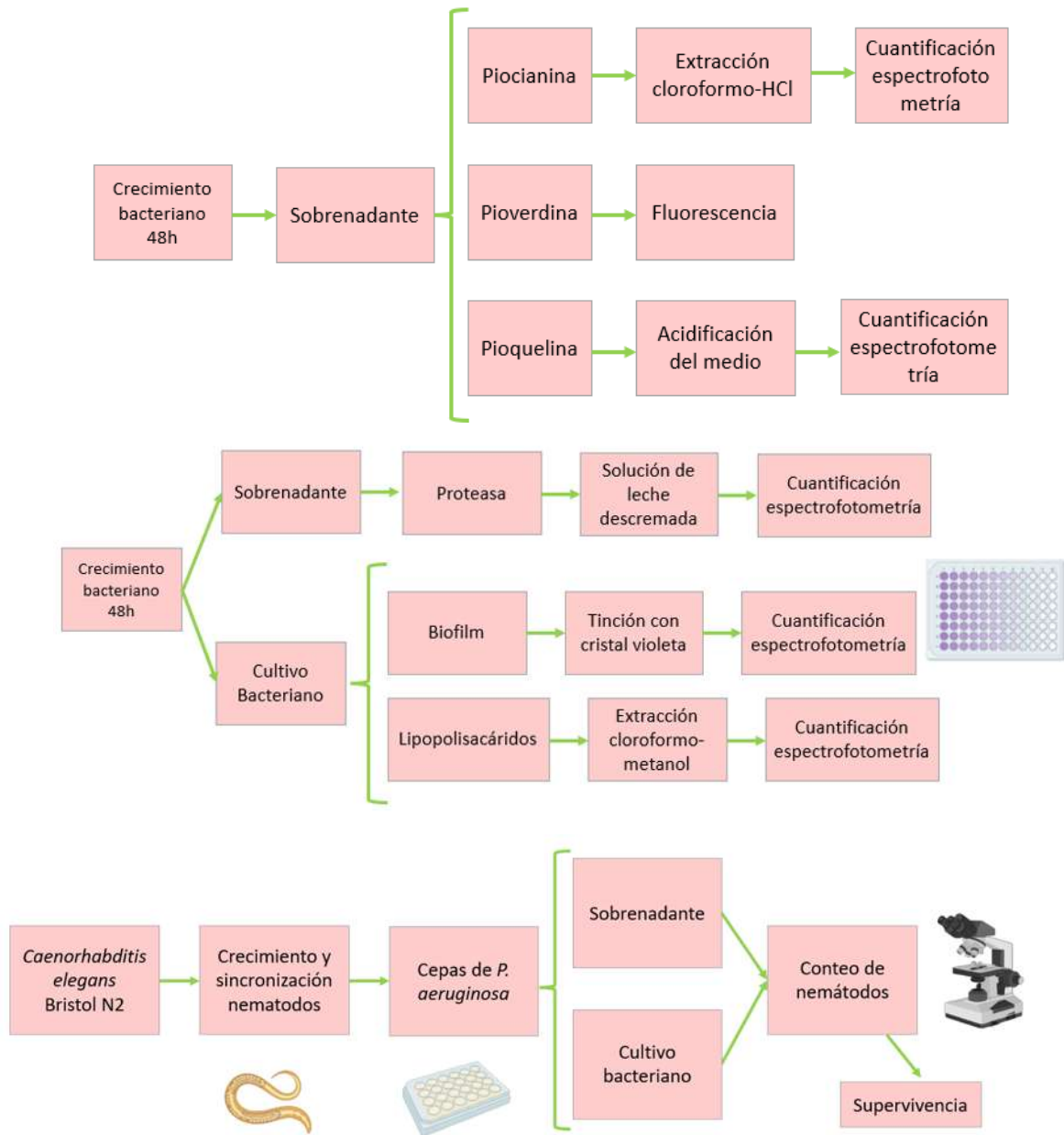
Determinar la implicación del ORF PA4078 de *P. aeruginosa* PAO1 en la virulencia de la bacteria.

5.2. Objetivos específicos

- 1.- Evaluar el efecto de la mutación del ORF PA4078 sobre la producción de factores de virulencia en *P. aeruginosa* PAO1.
- 2.- Determinar la participación del ORF PA4078 en la patogenicidad de *P. aeruginosa* PAO1.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Material biológico

Tabla 2. Organismos empleados

Organismo	Cepa	Características	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	Cepa estándar de laboratorio; Sm ^R .	Stover <i>et.al.</i> , 2000
	JM2 $\Delta lasI/\Delta rhII$	Mutante doble en $\Delta lasI$, $\Delta rhII$; Tc ^R .	Latifi <i>et al.</i> , 1996
	PA4078::Gm/6	Cepa PAO1 con mutación por interrupción génica con casete de gentamicina en el ORF PA4078. Sm ^R y Gm ^R .	Este trabajo
	PA4078::Gm/15	Cepa PAO1 con mutación por interrupción génica con casete de gentamicina en el ORF PA4078. Sm ^R y Gm ^R .	Este trabajo
	PA4078::Gm/17	Cepa PAO1 con mutación por interrupción génica con casete de gentamicina en el ORF PA4078. Sm ^R y Gm ^R .	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i>	JM101	Cepa estándar de laboratorio para clonación de fragmentos de ADN.	Yanisch <i>et al.</i> , 1985
	pKOK4	Cepa que posee el plásmido pKOK4. Ap ^R y Tc ^R .	Kokotek & Lotz, 1991
	pBSL141	Cepa que posee el plásmido pBSL. Gm ^R .	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
	pRK2013	Cepa auxiliar para la formación de pili en la conjugación bacteriana. Km ^R .	Figurski & Helinski, 1979
	S17-1	Cepa donadora utilizada en la conjugación bacteriana.	
	pUCP20	Cepa que posee el plásmido pUCP20 utilizado en clonación. Ap ^R .	West <i>et al.</i> , 1994

	pUCP20-4078	Cepa JM101 transformada con la construcción pUCP20-4078. Sm ^R y Ap ^R .	Este trabajo
	OP50	Cepa usada como alimento de nematodos. Sm ^R .	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	N2	Cepa estándar de laboratorio.	Derivada de la cepa silvestre Bristol: Brenner, 1974

Tabla 3. Plásmidos

Plásmido	Características	Referencias
pGEM-T Easy (Promega)	Plásmido utilizado para clonar productos de PCR, posee varios sitios de restricción en los externos del sitio de inserción	Yanisch <i>et al.</i> , 1985
pKOK4	Plásmido suicida que tiene el gen <i>mob</i> utilizado en la conjugación bacteriana.	Kokotek & Lotz, 1991
pBSL141	Plásmido que contiene el caset de resistencia a gentamicina.	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pUCP20	Plásmido de tamaño pequeño usado para expresar genes, puede replicarse en <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> .	West <i>et al.</i> , 1994

Tabla 4. Oligonucleótidos

Secuencia	Gen	Tamaño del fragmento en kb
FW 5' CGGGCGTCTGCCTGGCGCGCGAATACC 3' RV 5' TGCCGGCCAGCTCGCGATAGGTTTCCG 3'	<i>PA4078</i>	1.1
FW 5' GTTGGACTGAGTCCGGTCCCGC 3' RV 5' CATCCGCCAGTCCCAGGCCGAT 3'	<i>PA4078</i>	3.3
FW 5' ACGCGTATCAAAGTGCATCACTTCTTC 3' RV 5' ACGCGTCAATTCTCGAATTGACATAAGC 3'	<i>aacC1</i>	0.9

Tabla 5. Enzimas y antibióticos

Reactivo	Características
Enzima de restricción <i>EcoRI</i>	Secuencia de corte g/aattc.
Enzima de restricción <i>SalI</i>	Secuencia de corte g/tcgac.

T4 DNA Ligasa	Enzima que cataliza la ligación de dos fragmentos de ADN.
Super Fi II DNA Polimerasa	Enzima que cataliza la síntesis de ADN en una PCR.
Platinum Pfx DNA Polimerasa	Enzima que cataliza la síntesis de ADN en una PCR.
Taq DNA Polimerasa	Enzima que cataliza la síntesis de ADN en una PCR.
Fosfatasa alcalina SAP	Enzima que lleva a cabo la desfosforilación.
Estreptomicina (Sm)	Antibiótico estándar de laboratorio como marcador de selección: PAO1 y mutantes sencillas.
Gentamicina (Gm)	Antibiótico estándar de laboratorio como marcador de selección: mutantes sencillas.
Tetraciclina (Tc)	Antibiótico estándar de laboratorio como marcador de selección: mutante Δ lasI/ Δ rhII.
Ampicilina (Ap)	Antibiótico estándar de laboratorio como marcador de selección: cepas de <i>E. coli</i> y sobreexpresante.
Kanamicina (Km)	Antibiótico estándar de laboratorio como marcador de selección: cepa pRK2013.

7.2. Medios de cultivo

Medio Luria-Bertani (LB)

Es un medio nutritivo estándar de laboratorio para crecer bacterias. Se utilizó para crecer las cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli*.

Para preparar 100 ml de medio:

1.0 g de peptona de caseína (Solbios)

0.5 g de extracto de levadura (BD Bioxon)

0.5 g de cloruro de sodio (J.T. Baker)

Para medio sólido: 1.5g de agar (BD Bioxon)

Se esterilizó a 15 lb de presión a 121°C por 15 minutos.

Medio mínimo M9

Es un medio que contiene los nutrientes mínimos necesarios para el crecimiento bacteriano y da la opción de agregar cualquier fuente de carbono.

Para 250 ml de medio M9 20x:

30 g de K_2HPO_4

15 g de KH_2PO_4

2.5 g de NaCl

5 g de NH_4Cl

Para 100 ml de agar M9: 1.5 g de agar (BD Bioxon) y 95 ml de agua destilada

Se ajustó el pH a 7.4 en el medio M9 20x. El medio M9 agar y 20x se esterilizó a 15lb de presión a 121°C por 15 minutos.

Medio NGM (Nematode Growth Medium)

Es un medio utilizado para el crecimiento de *Caenorhabditis elegans*.

Para preparar 100 ml de medio:

0.2 g de cloruro de sodio (J.T. Baker)

0.4 g de peptona de caseína (Solbiosa)

0.3 g de fosfato de potasio monobásico (Golden Bell)

0.05 g de fosfato de potasio dibásico (Meyer)

2g de agar (BD Bioxon)

Se esterilizó a 15 lb de presión a 121°C por 15 minutos. Posteriormente, se adicionó 0.1 ml de una solución de colesterol 5 mg/ml (Sigma-Aldrich) disuelto en etanol al 100% (J.T. Baker) y el volumen necesario de estreptomycin para una concentración final de 50 mg/ml.

7.3. Métodos

7.3.1 Construcción de la mutante

Condiciones de crecimiento de las cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli*

Las cepas fueron recuperadas del ultracongelador y se inocularon en 1 ml de medio LB líquido, se incubaron a 30°C 24 h con agitación. Posteriormente, cada cultivo se inoculó en cajas de LB sólido con su respectivo antibiótico en estría cruzada y se incubaron a 37°C 24 h. Pasado este tiempo, los cultivos en caja se mantuvieron en refrigeración a 4°C para su utilización en los experimentos.

Extracción de ADN total

Se crecieron las cepas en 3 ml de medio LB líquido con antibiótico a 30°C 24h con agitación. Se cosecharon las células en un tubo eppendorf de 1.5 ml a 12,000 rpm 1 min, y se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 450 µl de solución TE ⁵⁰/₂₀. Se agregó 10 µl de un stock 40 mg/ml de lisozima y se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente, se agregó 50 µl de proteinasa k de un stock 20 mg/ml y se incubó 15 min a 37°C. Pasado el tiempo, se añadieron 50 µl de SDS 10% y se incubó 30 min a 37°C. Se agregó a la solución 100 µl de NaCl 5M y se agitó exhaustivamente en el vortex por 15 min, se incubó en el baño seco 5 min a 65°C. Se añadieron 80 µl de CTAB/NaCl (tibio a 65°C) y se dejó en el baño seco por 10 min. Se agregó un volumen igual de cloroformo, se agitó en el vortex por 5 min y se centrifugó 7 min a 12,000 rpm, se recuperó la fase superior. Se agregaron 250 µl de fenol/cloroformo [1:1], se mezcló en el vortex y se centrifugó por 7 min, se recupera la fase

acuosa (superior) y se repitió este procedimiento dos veces. A la fase acuosa se le añadió 1 ml de etanol 60% isopropanol 40%. Se centrifugó y se recuperó la pastilla, se resuspendió en 1 ml de agua destilada y se guardó a -20°C para su uso posterior.

Electroforesis

Se preparó agarosa al 1% (1 g de agarosa en 100 ml de buffer TAE al 0.8x) y se fundió. Una vez que se enfrió un poco, se vació en una cámara para geles la cual está sellada por los extremos y tiene adaptado un peine que formará los pozos del gel. Se dejó solidificar la agarosa en la cámara. Se prepararon las muestras de ADN a analizar: se formaron gotas de aproximadamente 1 µl de buffer de carga y se cargaron los microlitros deseados de cada muestra. Una vez que el gel se encontraba solidificado, se retiró el peine del gel y se colocó en la cámara de electroforesis asegurando que el gel quedara cubierto de TAE. Las muestras de ADN se cargaron en cada pozo del lado de la carga negativa de la cámara. Se corrió el gel 30 min a 130 v. Pasado este tiempo, se retiró el gel de la cámara y se cortó el exceso de gel; se sumergió en una solución de bromuro de etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$) durante 5 min y se destiñó en agua. Se analizó el gel en un transiluminador que emite luz UV.

Reacciones de PCR

La reacción se llevó a cabo con la enzima Platinum Pfx DNA Polimerasa, las cantidades de los reactivos son las siguientes: 2.5 µl Buffer 10x, 0.5 µl dNTP 5mM, 1 µl $MgSO_4$ 50 mM, 2 µl Primer Fw, 2 µl Primer Rv, 5 µl ADN molde, 1.25 µl Enhancer, 0.2 µl Pfx DNA Polimerasa, 10.55 µl agua destilada estéril. El total de la reacción fue de 25 µl. Los primers utilizados fueron los que amplifican una región interna del gen de 1.1 kb.

Las reacciones de PCR se colocaron en un termociclador con las siguientes condiciones: desnaturalización 2 min 94°C, desnaturalización 30 segundos 94°C, alineación 30 segundos 56°C, extensión 1 min 68°C. Se dieron en total 35 ciclos. Los productos de PCR se guardaron a -20°C.

Purificación de ADN

Posterior a la electroforesis, se cortó la banda del tamaño deseado con ayuda de un bisturí y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Para la purificación se usó el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. Se agregaron 10 µl de la solución Membrane Binding por cada 10 mg de gel, se mezcló en el vortex y se incubó en el baño seco a 50-65°C hasta que el gel se disolviera por completo. Se transfirió el gel disuelto a una mini columna acoplada a un tubo de recolección y se incubó por 1 min, se centrifugó 1 min a 16,000 rpm y se tiró el sobrenadante. Se añadieron 700 µl de la solución Membrane Wash y se centrifugó 1 min, se tiró el sobrenadante y se repitió lo anterior con 500 µl de solución y se centrifugó 5 min. Se recentrifugó el tubo vacío por 1 min para eliminar residuos de etanol. Se transfirió la mini columna a un tubo limpio eppendorf de 1.5 ml y se agregó 50 µl de agua destilada estéril, se

incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó por otro minuto. Se retiró la mini columna y se guardó el ADN a -20°C.

Adenilación

Se realizó una reacción de 10 µl con los siguientes componentes: 0.4 µl de MgCl₂ 50 mM, 0.2 µl de dATP 10 mM, 1 µl de la enzima Taq DNA Polimerasa, 1 µl de Taq DNA polimerasa 10x Reaction Buffer, 3 µl del fragmento de ADN deseado, 4.4 µl de agua destilada. Se incubó en un vaso de precipitado con agua a 70°C durante 15-30 min y en agitación. Se dejó enfriar la reacción y se guardó a -20°C.

Ligación de ADN

Primero, se calculó la concentración del inserto de ADN que se deseaba ligar con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Nanogramos vector} \times \text{tamaño del inserto}}{\text{tamaño del vector (kb)}} \times \frac{\text{inserto } 5M}{\text{vector } 1M} = \text{ng del inserto}$$

Obtenido esto se realizó una reacción con los siguientes reactivos: 5 µl de Buffer 2x T4 DNA ligasa, 0.5 µl del vector [50 ng/µl], los µl calculados del inserto [50 ng/µl], 1 µl T4 DNA ligasa, agua destilada necesaria para completar 10 µl de reacción. Esta reacción se dejó a -20°C durante 48 h para su posterior uso.

Preparación de células competentes

De un cultivo en agar LB de la cepa de *E. coli* JM101, se recuperó una colonia aislada con la cual se inoculó un tubo con medio líquido LB y se incubó a 30°C por 24 h con agitación. Pasado este tiempo, con los 3 ml de cultivo se inoculó un matraz de 1 L con 250 ml de medio LB y se incubó durante 4-5 h a 37°C 125 rpm. A partir de las 4 h de incubación, se monitoreó la D.O. a 600 nm hasta que el cultivo alcanzó 1.0 de absorbancia.

Se colocó el matraz en un baño frío (hielo y agua) durante 10 min, agitando cada dos min para parar el crecimiento celular. Después, se cosechó el cultivo en tubos falcon estériles y previamente enfriados, se centrifugó a 4°C 5500 rpm durante 10 min; se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se realizaron lavados: se agregó 5 ml de agua destilada estéril y fría a los tubos, se resuspendieron las células en el vortex y se aforó a 45 ml con agua destilada; se centrifugó con las mismas condiciones antes mencionadas. El segundo lavado con agua se llevó a cabo de la misma manera y se aforó a 35 ml; posteriormente se desechó el sobrenadante. El tercer lavado se realizó con glicerol 10% al igual que el primer lavado. En el último lavado se agregó 5 ml de glicerol 10% a cada tubo y se mezcló en vortex, las mezclas se juntaron en un solo tubo falcon y se aforó a 35 ml con glicerol; se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas una vez más en 1.5 ml de glicerol y se obtuvieron alícuotas de 100 µl en tubos eppendorf. Los viales se guardaron a -80°C.

Para probar la efectividad de las células se llevó a cabo una electroporación prueba (como se describe posteriormente en este trabajo). Se tomaron dos viales de células: uno control y otro al que se le agregó 0.5 µl de un plásmido con resistencia a ampicilina. Posterior a la electroporación, se espatuló 100 µl en cajas de LB con Ap¹⁰⁰. A las 24 h de incubación, en la caja control no creció ninguna colonia ya que no posee el plásmido de resistencia al antibiótico, y en la otra caja se observó el crecimiento de colonias bacterianas.

Transformación de células competentes por electroporación

El procedimiento se realizó en frío con hielo. En un vial de células competentes de 100 µl se agregaron 2 µl de la reacción de ligación de interés. Los 100 µl se vaciaron en una celda de electroporación estéril y fría. Esta celda se colocó en un electroporador con condiciones manual 2.4, se le dio un pulso eléctrico a la celda y se recuperaron las células en el mismo tubo eppendorf. Se agregaron 500 µl de medio LB y se dejaron reposar las células a 37°C durante 1 h. Posteriormente, en una caja LB adicionada con el antibiótico de selección de cada vector, se vació el cultivo completo y se espatuló con ayuda de perlas de cristal hasta que se secó por completo el cultivo. Se incubó a 37°C 24 h.

Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina

Se crecieron las cepas en 3 ml de medio LB líquido con antibiótico a 30°C 24h con agitación. Se cosecharon las células en un tubo eppendorf de 1.5 ml a 12,000 rpm 1 min, y se desecharon el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 150 µl de STE y se mezcló en vortex. Se agregó 250 µl de solución de lisis NaOH 0.2 N / SDS 1% (25 µl NaOH 2 N, 25 µl SDS 10% y 200 µl agua destilada) y se mezcló en el vortex, se incubaron 10 min en hielo. Después, se añadió 150 µl de Acetato de Sodio 3 M, se homogeneizó y se incubó en hielo 10 min. Se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm, y se agregaron 150 µl de fenol-cloroformo [1:1], se mezcló y se centrifugó 7 min. De lo obtenido se recuperó en un tubo limpio la fase acuosa (superior) y se adicionó 700 µl etanol 60%/isopropanol 40%; se agitó manualmente y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó 4 min y se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 1 ml de etanol 70% y se despegó la pastilla. Se centrifugó 2 min y se desecharon el sobrenadante, se trató de extraer lo más posible de etanol y se dejó secar el tubo abierto a 37°C. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 50 µl de agua destilada estéril y se agregaron 3 µl de RNAsa. Las muestras se guardaron a -20°C.

Restricciones parciales y totales

Se llevó a cabo la reacción de restricción con los siguientes reactivos: 3 µl del ADN que se desea digerir, 2 µl Buffer Tango 10x, 0.3 µl de la enzima elegida, 14.7 µl de agua destilada estéril. El volumen total de la reacción fue de 20 µl; se deja incubando a 37°C 24 h. Si se desea obtener una mayor cantidad de ADN digerido se calculan las cantidades de los reactivos para obtener un volumen final de 250 µl. Para las restricciones parciales, se monitoreó la actividad de la enzima a partir de la primera hora desde que comenzó la reacción

hasta que se observó una banda del tamaño deseado en un gel de agarosa. Se inactivó la enzima a 75°C por 10 min.

Conjugación tripartita

Se llevó a cabo la conjugación con tres cepas: cepa donadora (S17-1 con la construcción deseada), cepa auxiliar (pRK2013), y la cepa receptora (PAO1 y Mutantes simples por transposón de *P. aeruginosa*).

A partir de un cultivo en caja de cada una de las cepas, se tomó una colonia para inocular un tubo con 3 ml de medio LB con su correspondiente antibiótico y se incubaron a 30°C 24 h con agitación. Pasado este tiempo, se realizó una mezcla de conjugación con tres diferentes proporciones: 500 µl cepa receptora, 500 µl cepa auxiliar, 500 µl cepa donadora [1:1:1]; 1000 µl receptora, 500 µl auxiliar, 500 µl donadora [2:1:1]; 1500 µl receptora, 500 µl auxiliar, 500 µl donadora [3:1:1]. Estas mezclas se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml LB. Estos cultivos se esparcieron en una caja de LB agar y se incubaron 24 h a 37°C. Posteriormente, se barrió todo el cultivo que se formó en las cajas y se resuspendió en 1 ml LB, con este cultivo se realizó una dilución 1:10 (100 µl cultivo y 900 µl LB). De la dilución se espatuló 100 µl en cajas de LB con su respectivo antibiótico, se incubó 24 h a 37°C.

7.3.2 Confirmación de la mutación

Amplificación de la construcción por PCR

Las reacciones se llevaron a cabo con la enzima Super Fi II DNA Polimerasa, las cantidades de los reactivos son las siguientes: 2 µl Buffer 5x, 0.2 µl dNTP 10mM, 0.5 µl Primer Fw, 0.5 µl Primer Rv, 1 µl ADN molde, 2 µl Enhancer 5x, 0.1 µl Super Fi II DNA Polimerasa, 3.7 µl agua destilada estéril. El total de la reacción fue de 10 µl.

Los primers utilizados fueron los que amplifican el gen completo de 3.3 kb (PA4078 completo) y los que amplifican el cassette de resistencia a gentamicina de 0.9 kb (aacC1). Se usaron en la siguiente combinación:

- Primera PCR: con el ADN total de PAO1 y PA4078::Gm se usaron los primers Fw y Rv aacC1 (esta PCR amplificó solo el casete de Gm^R).
- Segunda PCR: con el ADN total de PAO1 y PA4078::Gm se usaron los primers Fw aacC1 y Rv PA4078 completo.

Las reacciones de PCR se colocaron en un termociclador con las siguientes condiciones: desnaturalización 2 min a 94°C, desnaturalización 30 segundos a 94°C, alineación 30 segundos a 60°C, extensión 1 min por cada 1 kb a 68°C. Se dieron en total 35 ciclos. Los productos de PCR se guardaron a -20°C.

Prueba de citronelol

Se prepararon dos medios de agar M9. En uno de los matraces se agregó: 5 ml de Buffer M9 20x, 200 µl de MgSO₄ 1M, 10 µl de CaCl₂ 1M, 250 µl de trazas de metales. En el otro matraz se agregó 1 ml de glucosa 20%. Con el primer matraz se obtuvieron dos cajas de Petri de vidrio y del segundo dos cajas de Petri de plástico, estas cajas se usarán como control. Se inocularon las cajas tanto de vidrio como de plástico con las mismas cepas. Se cortó un papel filtro del tamaño de las cajas de Petri de vidrio y se le agregaron 500 µl de citronelol por toda la superficie, este papel se colocó en la tapa de las cajas Petri. Se incubaron los cultivos a 37°C 24h.

7.3.3 Clonación del ORF PA4078

Reacciones de PCR

La reacción se llevó a cabo con la enzima Super Fi II DNA Polimerasa, las cantidades de los reactivos son las siguientes: 5 µl Buffer tricina, 0.5 µl dNTP 10mM, 1.25 µl Primer Fw, 1.25 µl Primer Rv, 2.5 µl ADN molde, 5 µl Enhancer 5x, 0.25 µl Super Fi II DNA Polimerasa, 9.25 µl agua destilada estéril. El total de la reacción fue de 25 µl. Los primers utilizados fueron los que amplifican el gen completo de 3.3 kb.

Las reacciones de PCR se colocaron en un termociclador con las siguientes condiciones: desnaturalización 2 min 94°C, desnaturalización 30 segundos 94°C, alineación 35 segundos 42°C, extensión 3 min 72°C. Se dieron en total 35 ciclos. Los productos de PCR se guardaron a -20°C.

Desfosforilación

Se llevó a cabo la reacción con el plásmido pUCP20 linealizado con la enzima *EcoRI*. Las cantidades de los reactivos son las siguientes: 30 µl de pUCP20, 3 µl de Buffer SAP 10x, 3 µl de fosfatasa alcalina SAP. Se incubó la reacción a 37°C por 1 h. Pasado este tiempo, se inactivó la enzima a 75°C por 10 min. La reacción se guardó a -20°C para su uso posterior.

7.3.4 Cuantificación y caracterización de ciclodipéptidos

Extracción de ciclodipéptidos

Se crecieron las cepas en 3 ml de medio LB líquido con antibiótico a 30°C 24h con agitación. Pasado el tiempo, se inocularon aproximadamente 2.5×10^6 UFC de cada cepa en matraces con 30 ml de medio LB, se incubaron 72 h a 37°C con agitación 125 rpm. Los cultivos se centrifugaron en tubos Falcon durante 10 min a 24°C 5500 rpm, se recuperaron 10mL del sobrenadante. Al sobrenadante se le agregó acetato de etilo [acidificado con ácido acético (0.01%)] en proporción [1:2] y se agitó vigorosamente durante 2 min dejando descansar otros

2 min. Se dejaron separar las dos fases durante 5 min y con un embudo de separación, se recuperó el sobrenadante y separando la fase orgánica (superior). Se llevó a cabo una segunda extracción, al sobrenadante se le agregó acetato de etilo en proporción [1:1] y se repitieron los pasos siguientes. Los extractos se evaporaron en su totalidad en baño de agua a 60 °C en un rotavapor. Los residuos se volvieron a solubilizar en 1 ml de metanol, se centrifugaron las muestras (para separar cualquier contaminante) y se recuperó el sobrenadante en un tubo eppendorf limpio y se aforó a 1 ml con metanol. Las muestras se guardaron a 4°C.

Cuantificación y caracterización

La determinación de CDPs se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un equipo Variant con un detector de Photo Diode Array y una columna de HPLC Sephasil-Peptide C18, 12 μ 4.6 mm $\times$ 250 mm (Amersham) de fase inversa para el análisis de la muestra. Las fracciones se eluyeron con metanol, comenzando con una mezcla de solvente de equilibrio de 0:100; seguido de un gradiente lineal de 60:40, con un flujo de 1.2 ml/min durante 15 min; finalmente, siguiendo con un retorno a 0:100 de la mezcla de solventes por 3 min y una fase de equilibrio por 2 min. El agua desionizada y el acetonitrilo de grado HPLC se filtraron y desgasificaron. La cuantificación de CDPs se evaluó midiendo las unidades de área mostradas en cromatogramas, obtenidas del análisis de HPLC (González *et al.*, 2017).

7.3.5 Medición de los factores de virulencia

Biopelículas

A partir de un cultivo de 24 h de las cepas, se hicieron diluciones con LB (aproximadamente 1:50) que resultaban en una D.O. a 600 nm de 0.1. De dichas diluciones, se agregaron 150 μ l en placas de 96 pocillos, se puso un control con medio LB y se incubó a 37° por 48 h. Posteriormente, se hizo un lavado a la placa con agua destilada estéril para eliminar el medio y células que no se hayan adherido, se añadió 100 μ l de isopropanol para fijar las biopelículas y se dejó destapado 24 h a 37°C. Se tiñeron las biopelículas con 125 μ l de cristal violeta al 0.5% y se dio un lavado, se dejó secar destapado 24 h a 37°C. Para leer las muestras, se solubilizaron las biopelículas teñidas con 150 μ l de ácido acético al 30%, se midió la densidad óptica a 550 nm (Coffey & Anderson, 2014).

Pioverdina

Al ser una molécula que emite fluorescencia se cuantificó de la siguiente manera: se inocularon con las cepas tubos con 3 ml de LB y antibiótico, se incubaron a 30°C durante 48 h con agitación. Pasado el tiempo, se centrifugaron los cultivos y se recuperaron 2 ml de sobrenadante. La intensidad de fluorescencia relativa se midió a 460 nm mientras la excitación se midió a 405 nm en un espectrofluorómetro (Höfte *et al.*, 1993).

Pioquelina

Se inocularon matraces con 30 ml de LB con cultivos de 24 h, se incubaron a 37°C por 48 h con agitación 125 rpm. Se centrifugó el cultivo y se obtuvo el sobrenadante, solamente se tomaron 5 ml de sobrenadante, los cuales fueron acidificados con ácido cítrico hasta un pH de 3.0. Se añadió 1 ml de diclorometano (CH_2Cl_2) y las muestras se mezclaron. Se centrifugaron y se recuperó la fase orgánica (inferior) y se evaporó hasta sequedad. La pioquelina se recuperó agregando 800 μl de metanol al 80%. Se midió la absorbancia a 313 nm y la cuantificación se realizó siguiendo la ley de Beer-Lambert, el coeficiente de extinción molar (ϵ) de PCH es 4,900 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ en $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (Hoegy *et al.*, 2014).

Piocianina

Se inocularon matraces con 30 ml de LB con pre cultivos de 24 h, se incubaron a 37°C por 48 h con agitación 125 rpm. Se centrifugó el cultivo a 5,500 rpm durante 10 min y se obtuvo el sobrenadante, solamente se tomaron 5 ml de sobrenadante. Se añadió 3 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente en el rotor por 30 min. Después, se retiró la fase de LB y se conservó la fase orgánica (inferior). Se agregó 1 ml de HCl al 0.2 N y se agitó vigorosamente en el rotor por 30 min. Se recuperó la fase del HCl (color rosa) y se midió la densidad óptica a 520 nm (Ortiz-Castro *et al.*, 2014)

Elastasa

Cultivos de 48 h de las cepas se centrifugaron y se recuperaron 250 μl de sobrenadante. Por cada muestra se necesitó 1 ml del Buffer A (TRIS-HCl 0.1M, CaCl_2 1 mM, pH 7) y 2 mg de Elastin-Congo Red. Se agregó 1 ml de Buffer A con el colorante disuelto al sobrenadante y se incubó a 37°C 24 h con agitación. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 min, se separó el sobrenadante y se realizó una dilución 1:10, se midió la densidad óptica a 495 nm (Köhler *et al.*, 2014).

Ramnolípidos

Cultivos de 48 h de las cepas se centrifugaron y se recuperó 1 ml de sobrenadante, se acidificó con HCl 6N a pH 2.0, se dejaron las muestras tres días a 4°C. Después, se centrifugó por 1 h a 10,000 rpm y se desechó el sobrenadante, se agregó 1 ml de cloroformo/metanol [2:1]. Las muestras se agitaron de 15 min, posteriormente se resuspendieron las muestras y se agitaron otros 10 min. Se centrifugaron 5 min a 10,000 rpm. Se tomaron 600 μl y se pasaron a un tubo limpio, se dejó evaporar. Los ramnolípidos obtenidos se disolvieron en 100 μl de agua destilada. La cuantificación se realizó utilizando el método de Orcinol por cuantificación de la ramnosa. Se añadieron 900 μl de Orcinol (0.19% Orcinol/53% H_2SO_4) y las muestras se pusieron en un baño de agua a 80°C por 30 min. Pasado el tiempo, y que las muestras llegaran a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 421 nm. La concentración se calculó reemplazando los valores en la curva estándar de ramnosa basada en el estudio de Marchant y Banat (Çakmak *et al.*, 2017).

Lipopolisacáridos

A partir de cultivos de 24 h, con ayuda de un isopo, se esparció el cultivo en una caja Petri con medio LB, se incubó a 37°C por 24 h. Se barrió el cultivo de la caja y se resuspendió en 1 ml de PBS, se centrifugó y se obtuvieron los concentrados celulares. Las pastillas se resuspendieron en 500 µl de 1x SDS-Buffer, y se incubaron en baño de agua a 60°C durante 15 min. Posteriormente se agregaron 10 µl de proteinasa K 20^{mg/ml} y se incubaron a 60°C durante 24 h. Se agregaron 200 µl de fenol al 5% frío y se agitó en vortex. Después se incubaron a 65°C durante 15 min (Latino *et al.*, 2017). Para diluir, se agregó un volumen de agua destilada estéril y se sonicó. Para la cuantificación de LPS, se midieron los polisacáridos de la superficie por el método colorimétrico de ácido sulfúrico-fenol (Brimacombe & Beatty, 2013). Se utilizó como estándar de azúcar una mezcla 50:50 de sacarosa y fructosa diluida de un stock de concentración conocida. A 20 µl de las muestras se le añadió 180 µl de agua y 100 µl de fenol 5%. Se agregaron 500 µl de ácido sulfúrico 93% y se mezcló. Posteriormente, se midió la absorbancia a 490 nm, estos datos se correlacionaron con la curva obtenida con los estándares de carbohidratos de concentraciones conocidas.

Proteasas totales

Cultivos de 48 h de las cepas se centrifugaron 10 min a 5,000 rpm y se recuperaron 50 µl de sobrenadante. Se agregaron 950 µl de solución de leche sin grasa al 1% (1 g de leche sin grasa en polvo se disuelve en 100 ml de agua destilada estéril y se esteriliza a 115°C por 5 min) y se mezclaron las muestras. Se dejaron incubando a 37°C durante una hora. Pasado el tiempo se lee la absorbancia a 600 nm (Saleh *et al.*, 2019).

7.3.6 Patogenicidad en un modelo *in vivo*

Crecimiento y mantenimiento de *Caenorhabditis elegans*

Para la preparación de la fuente de alimento de los nematodos se incubó un medio LB líquido inoculado con *E. coli* OP50 a 30°C 24h con agitación a 200 rpm. Se tomaron 160 µl del cultivo de *E. coli* y se esparció en cajas Petri de 60x15 mm con agar NGM. Se incubaron a 30°C por 48 h hasta su crecimiento total. Para propagar *C. elegans* se transfirieron cortes de agar con una gran población de nematodos a las cajas Petri con OP50, se dejaron incubar a 16°C.

Sincronización de *Caenorhabditis elegans*

Se trabajó con las cajas de nematodos que tuvieran suficiente cantidad de huevos. Dichas cajas se lavaron con 3.5 ml de agua destilada estéril y se recuperó en un tubo Falcon. Se agregó 1 ml de una solución de cloro y agua [3:2] y 0.5 ml de NaOH 3N. Se dejó reposar durante 5 min resuspendiendo por inversión cada 2 min. Se repartió el volumen en 3 tubos eppendorf y se centrifugó a 1300 rpm durante 30 segundos. Se retiró el exceso de

sobrenadante dejando aproximadamente 100 μ l y se realizaron dos lavados con agua destilada centrifugando 15 segundos a 1300 rpm. Finalmente se agregó 1 ml de medio M9 y se incubaron a 16°C hasta que eclosionaron todos los huevos. En dicho momento se transfirieron con pipeta los nematodos a una caja Petri con OP50 previamente crecida y se incubaron a 16°C.

Ensayos de virulencia

Las cajas Petri con los nematodos sincronizados de dejaron incubando hasta que se encontraran en la fase de crecimiento L3/L4. Se lavó la caja con 1 ml de agua destilada estéril y se centrifugó a 1300 rpm por 10 segundos y se realizó un lavado con agua destilada. Se agregan 10 μ l y se observan cuántos nematodos hay en dicho volumen, con eso en cuenta se agrega el volumen necesario a una placa de 24 pozos para asegurar que haya entre 10 a 20 nematodos por pozo.

Para los ensayos con sobrenadante: se obtuvieron los sobrenadantes de cultivos de 48 h, dichos cultivos se pasaron por filtros de 0.2 μ m. Se agregó 1 ml de éstos a cada uno de los pozos con los nematodos. Los nematodos fueron observados cada 12 h mediante microscopio invertido con el objetivo 4X durante un periodo de 48 h. El criterio que se siguió para determinar la muerte del nematodo es cuando éste permanece inmóvil.

Para los ensayos con cultivo bacteriano: se usaron cultivos de 48 h, los cuales fueron ajustados a una D.O de 0.3 con medio LK preparado con Caldo SK y medio S Basal+ [1:3]. Se agregó 1 ml del cultivo diluido a cada uno de los pozos. Los nematodos fueron observados mediante microscopio invertido 4X cada 12 h durante 84 h. El criterio que se siguió para determinar la muerte del nematodo es cuando éste permanece inmóvil.

7.3.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados en el programa STATISTICA 12. Se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para analizar los datos resultantes de la cuantificación de factores de virulencia, con el nivel de significancia $\alpha = 0.05$. Se usó la prueba de Tukey como post hoc para determinar las diferencias significativas entre los grupos. En el caso de los resultados de la cuantificación de CDPs se realizó un T-test para muestras independientes por grupos ($p \leq 0.05$). Las gráficas correspondientes se realizaron en el programa GraphPad Prism 8.

8. RESULTADOS

8.1. Construcción de la mutante PA4078::Gm por recombinación homóloga en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Para obtener una mutante del ORF PA4078, se amplificó por medio de PCR un fragmento interno de 1.1 kb del gen con oligos específicos (Tabla 4). Como se muestra en la figura 14, a partir de la reacción de PCR, se purificó un fragmento de 1.1 kb que será usado para los pasos siguientes.

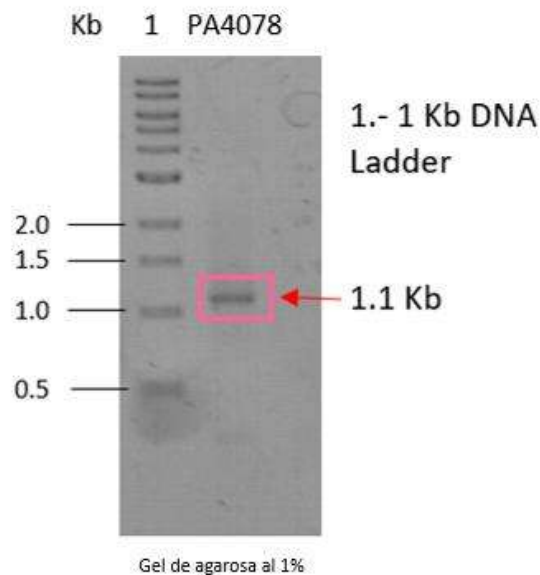
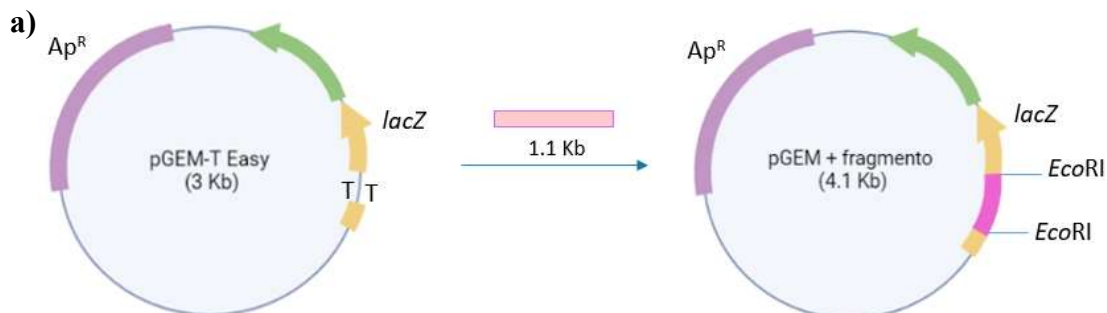


Figura 14. Electroforesis del fragmento interno de PA4078. Carril 1 marcador molecular, carril 2 muestra purificada de 1.1 kb.

Con el fin de clonar el fragmento interno, se llevó a cabo una reacción de ligación en la cual se insertó el producto de la PCR en el plásmido pGEM-T Easy, obteniendo una construcción de aproximadamente 4.1 kb. Posteriormente, la construcción se transformó por electroporación en la cepa competente JM101 de *E. coli*. Para seleccionar las clonas transformadas se usó un medio con ampicilina. Se confirmó la transformación por medio de una reacción de restricción con la enzima *EcoRI*, donde se observa una banda del tamaño del plásmido y una del fragmento ligado (Figura 15).



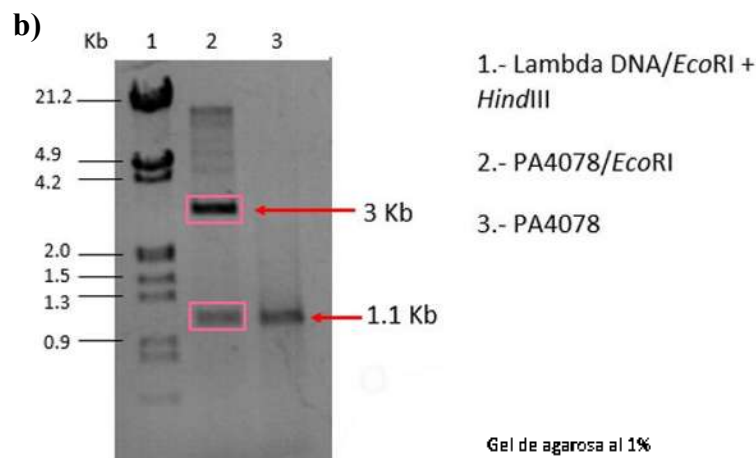


Figura 15. Clonación del fragmento interno en pGEM-T Easy. **a)** Esquema general del proceso de ligación y construcción final. **b)** Electroforesis en gel de agarosa para confirmar la transformación. Carril 1 marcador molecular, carril 2 construcción cortada con *Eco*RI, carril 3 fragmento interno purificado.

El cassette de resistencia a gentamicina usado para interrumpir el gen se obtuvo de la cepa pBSL141. Se aisló el plásmido pBSL141 el cual alberga el gen del cassette de resistencia a gentamicina y está flanqueado por múltiples sitios de restricción. Se utilizó la enzima *Sal*I para obtener el cassette y se purificó, dando como resultado un fragmento de aproximadamente 900 pb (Figura 16).

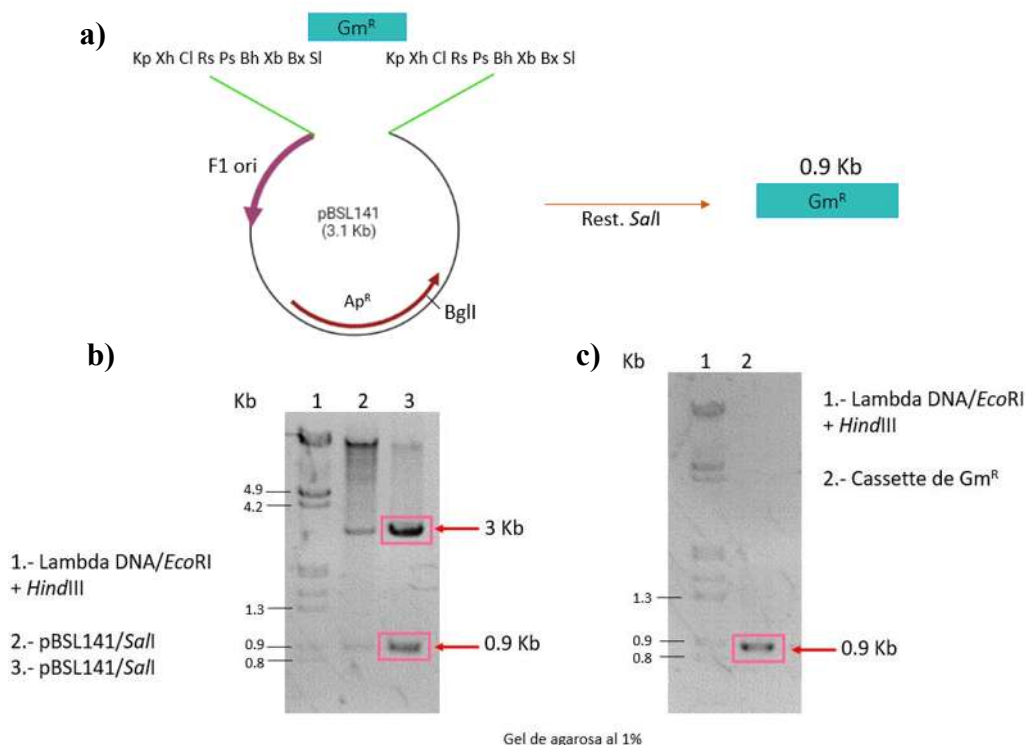


Figura 16. Obtención del cassette de resistencia a gentamicina. **a)** Esquema del plásmido pBSL141. **b)** Electroforesis de la restricción del plásmido con *Sal*I. **c)** Purificación del cassette de aproximadamente 0.9 kb.

Posteriormente se interrumpió el fragmento PA4078 que se encontraba en la construcción con el cassette de resistencia a gentamicina. Para ello se linealizó el plásmido pGEM-PA4078 con la enzima de restricción *SalI* y se llevó a cabo una reacción de ligación con el plásmido y el cassette. Posteriormente se transformó en la cepa JM101, para seleccionar las clonas se usó medio con gentamicina. Se confirmó la transformación con una restricción con *EcoRI*, en donde se observó una banda del tamaño del plásmido y otra de aproximadamente 1.5 kb, esto nos indica que en el proceso de ligación y transformación se perdió un fragmento del gen, por lo que la construcción quedó con solo un fragmento y el cassette de Gm^R (Figura 17).

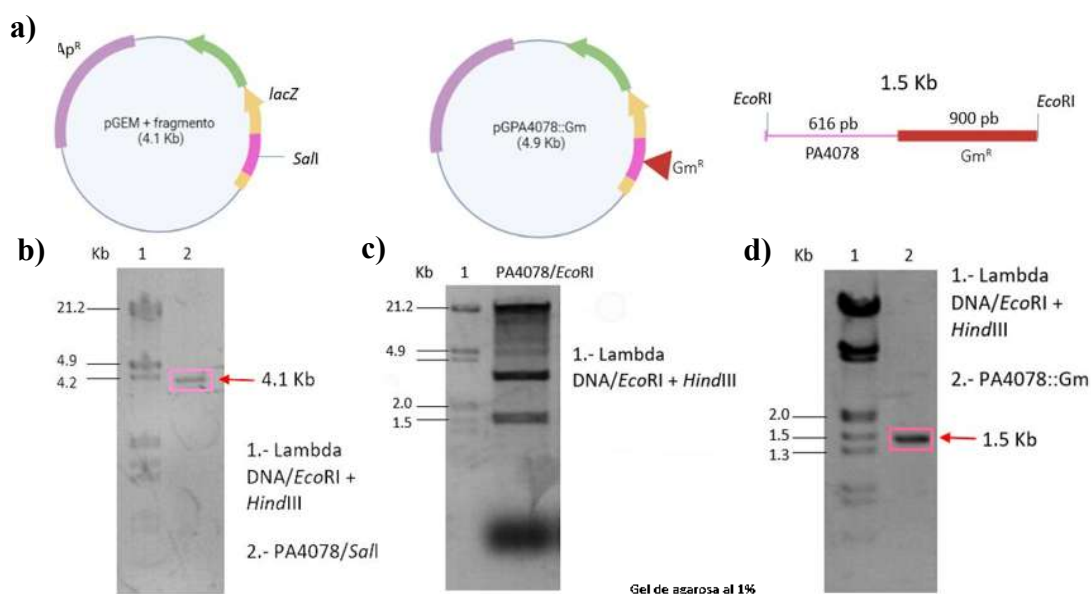


Figura 17. Interrupción del fragmento PA4078 con el cassette de Gm^R. **a)** Esquema general de las construcciones, y esquema de la construcción final con el fragmento perdido. **b)** Electroforesis de la linealización con *SalI*. **c)** Restricción con *EcoRI*. **d)** Purificación de la construcción final con 1.5 kb.

Teniendo clonada la construcción final en pGEM, se procedió a purificarla por medio de restricción con *EcoRI*. Se utilizó el plásmido pKOK4 (llamado plásmido suicida ya que no tiene origen de replicación en *P. aeruginosa*) linealizado con *EcoRI* y la construcción final con el cassette de Gm^R en una reacción de ligación. Se transformó en la cepa JM101 y se seleccionaron las clonas en medio con ampicilina y gentamicina. Se confirmó la transformación con una restricción usando la endonucleasa *EcoRI* donde se observó una banda del tamaño del plásmido de aproximadamente 6.3 kb y la banda de la construcción de 1.5 kb (Figura 18).

Con el plásmido sub-clonado en pKOK4, se extrajo y se transformó en la cepa de *E. coli* S17-1. Esta cepa se utilizó como donadora en el proceso de conjugación, además se usó la cepa pRK2013 como auxiliar y finalmente la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* como la cepa receptora. La conjugación se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos (Figura 19). Al final se escogieron 17 clonas que crecieron en los antibióticos de selección

(gentamicina y estreptomycin), con las cuales, por fenotipo se escogieron tres que fueran homogéneas y se caracterizó la mutación molecularmente.

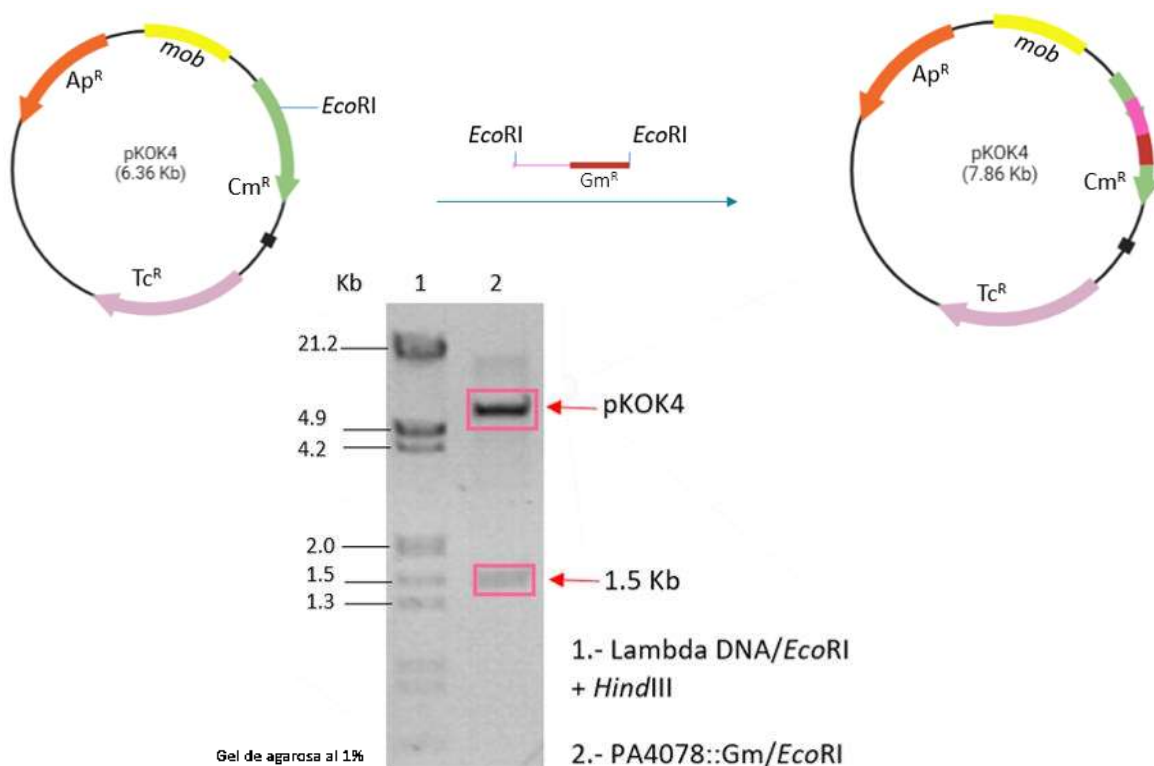


Figura 18. Sub-clonación del fragmento interrumpido en el plásmido pKOK4. Esquema general del procedimiento de sub-clonación y la construcción final. Electroforesis de geles de agarosa mostrando la restricción con *EcoRI* donde se observan las bandas con los tamaños deseados.

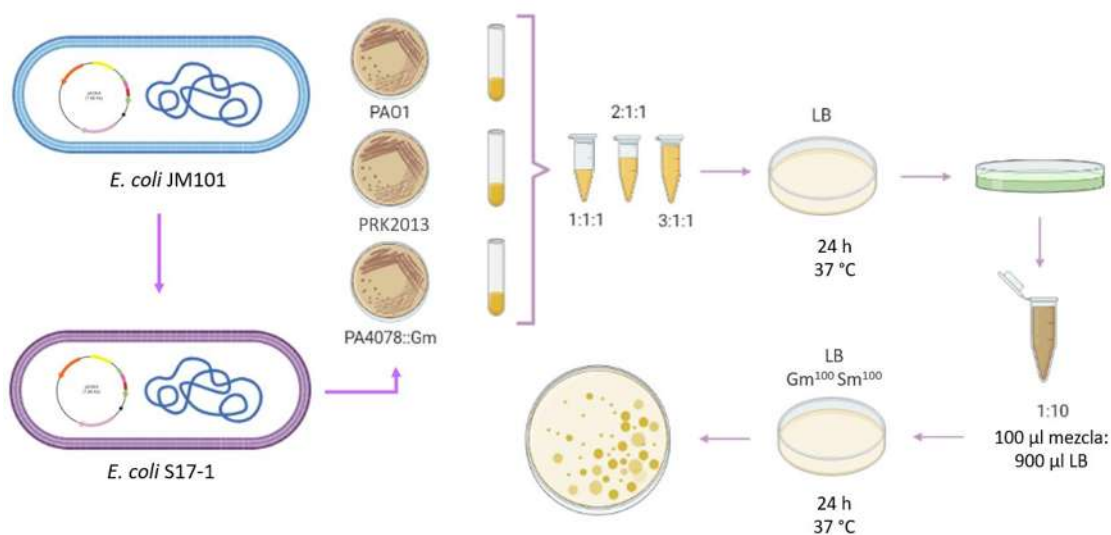


Figura 19. Conjugación tripartita. Esquema general del proceso de conjugación para obtener una mutante en el ORF PA4078 en *P. aeruginosa* PAO1.

8.2. Caracterización de la mutante PA4078::Gm de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Para caracterizar la mutante y asegurar la inserción del casete de Gm^R en el locus correcto, se llevaron a cabo dos reacciones de PCR. En la primer reacción se utilizó ADN de la cepa silvestre PAO1 y de la mutante PA4078::Gm, se usaron primers para amplificar el casete de resistencia a gentamicina (aacC1). Con el ADN de la mutante se amplificó la banda de aproximadamente 900 pb correspondiente al tamaño del casete usado en la construcción de la mutante. Mientras que en la reacción de PAO1 no se amplificó ninguna banda. Con esto podemos asegurar que el casete de Gm^R no se encuentra en la cepa silvestre y en la mutante sí (Figura 20a).

En la segunda reacción de PCR se usaron los mismos ADN con una combinación de oligonucleótidos, se usó el primer Fw de aacC1 y el primer Rv del ORF PA4078 completo. En la reacción de PAO1 no se amplificó una banda del tamaño esperado, reiterando que el casete de Gm^R no se encuentra integrado en su genoma. En la mutante amplificó una banda de aproximadamente 2.5 Kb (Figura 20b). Ya que los oligonucleótidos que amplifican el ORF completo fueron diseñados para amplificar el gen en su locus específico, confirmamos que la construcción se recombinó de manera homóloga en el lugar adecuado y no en otra región del genoma, obteniendo así una mutante en el ORF PA4078 (PA4078::Gm).

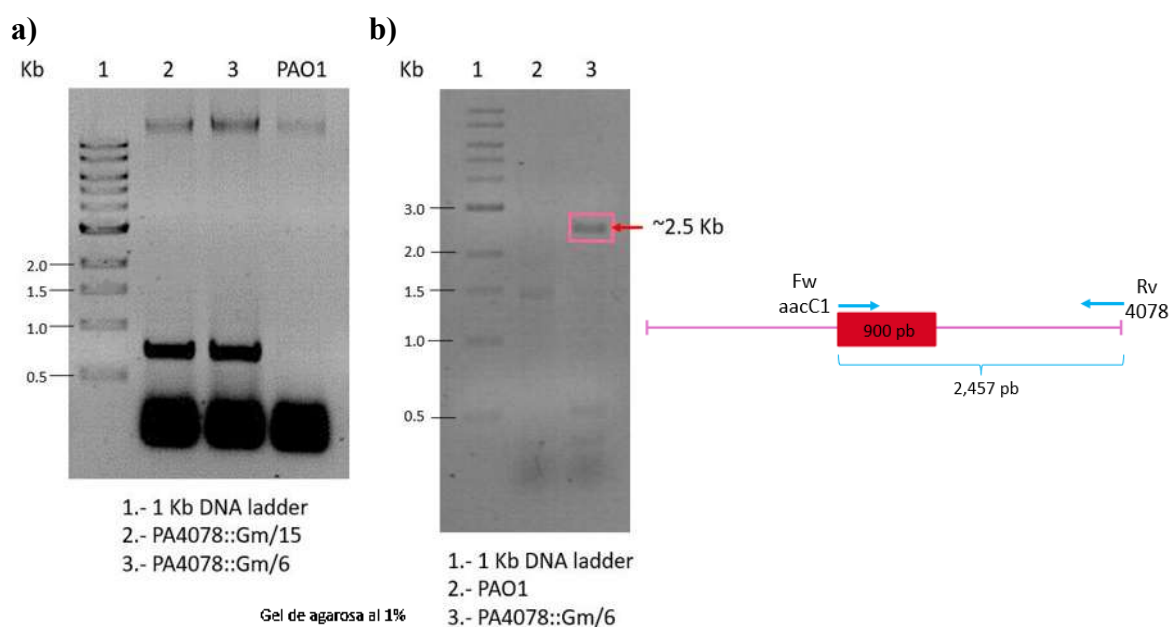


Figura 20. Caracterización de la mutante por medio de PCR. **a)** Electroforesis en gel de agarosa mostrando el PCR con los oligonucleótidos aacC1. **b)** Electroforesis en gel de agarosa mostrando el PCR con combinación de oligonucleótidos y esquema representativo del fragmento amplificado.

Como medida adicional se realizó un ensayo para asegurar que la mutante estuviera en nuestro organismo de interés, por lo que se hizo una prueba de citronelol. El fundamento consiste en que la cepa silvestre PAO1 utilizada como cepa receptora, tiene la capacidad de usar el citronelol como fuente de carbono en un medio mínimo a diferencia de otros

organismos como *E. coli*. Por tal motivo, se sembraron en una caja Petri con medio mínimo las cepas PAO1, JM101 (*E. coli*) y las tres clonas homogéneas de la mutante PA4078::*Gm* (6, 15, 17). Se adicionó el citronelol y se incubó para su crecimiento. Las clonas de la mutante crecieron en el medio de la misma manera que la cepa silvestre, a diferencia del control negativo JM101 (Figura 21). De tal manera, se confirmó que la mutante se encontraba en la cepa PAO1.

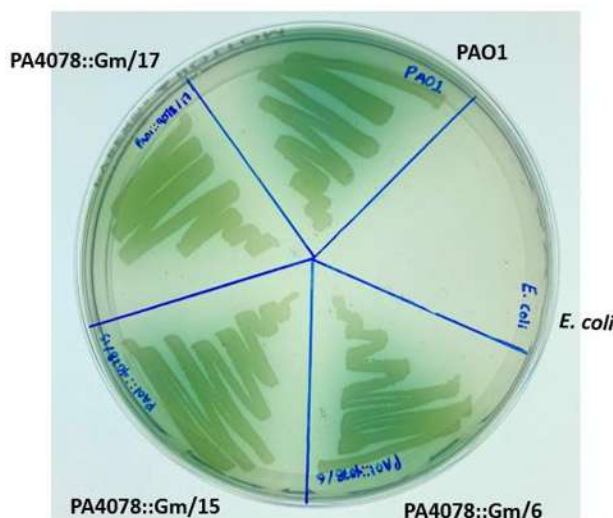


Figura 21. Imagen representativa del ensayo de crecimiento bacteriano en citronelol. Caja Petri con medio mínimo adicionado con citronelol.

8.3. Clonación del ORF PA4078 en *Escherichia coli*.

Con la finalidad de clonar el ORF PA4078 se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran la totalidad del gen (Tabla 4) y con ellos se realizó una reacción de PCR. Como se observa en la figura 22a, se amplificó un fragmento de aproximadamente 3 kb, lo que corresponde al tamaño del ORF.

El fragmento purificado se ligó con el plásmido pGEM-T Easy y se transformó en la cepa JM101 de *E. coli* con la finalidad de obtener un mayor número de copias del gen. Se recuperó el fragmento de PA4078 y se ligó en el plásmido pUCP20, este plásmido se utiliza para clonar en *E. coli* y *P. aeruginosa*. Esta ligación se transformó en JM101.

Se confirmó la clonación con reacciones de PCR. Se amplificó el fragmento de ~3 kb tanto en el ADN plasmídico de pUCP20 transformado, así como en el control de ADN total de PAO1. En contraste al ADN plasmídico del plásmido sin transformar no amplificó ninguna banda de 3 kb (Figura 22b). Con estos resultados se confirmó la clonación del ORF PA4078 completo en el plásmido pUCP20 en *E. coli*.

Se intentó transformar en *P. aeruginosa* PAO1 y PA4078::*Gm* sin éxito, por lo que se propone que en un futuro se utilice otro antibiótico de selección.

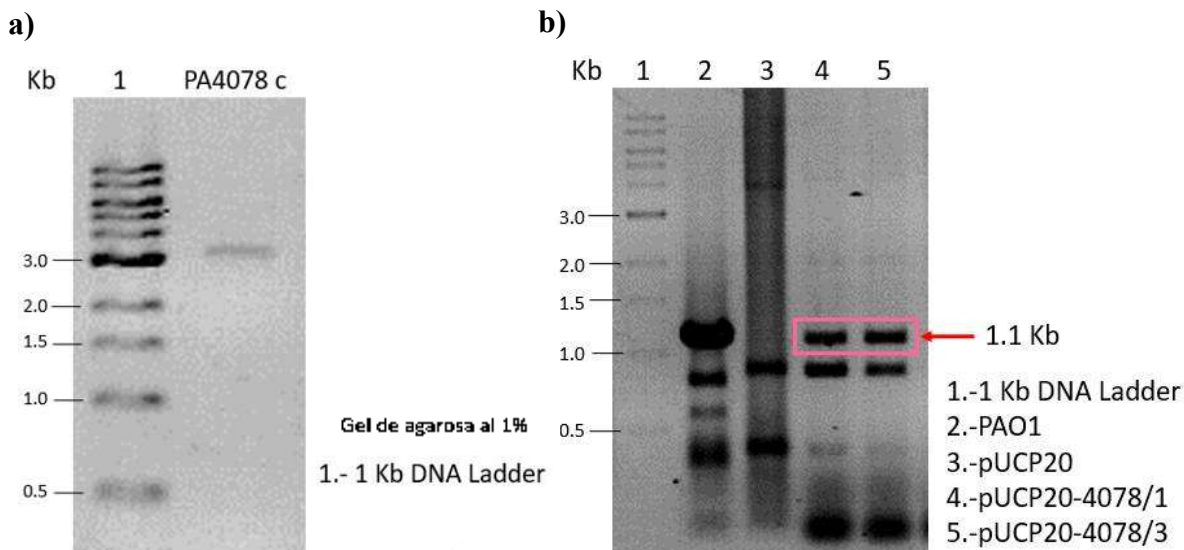


Figura 22. Electroforesis de geles de agarosa mostrando el ORF PA4078 completo. **a)** Amplicón purificado de PA4078 con un tamaño de ~3 kb. **b)** Confirmación de la clonación en *E. coli* por medio de PCR.

8.4. Extracción, cuantificación y caracterización de ciclodipéptidos.

Como se menciona en la introducción los ciclodipéptidos (CDPs) son moléculas que pueden interaccionar con los sistemas de Quorum sensing de *P. aeruginosa* y afectar la virulencia. Se propone que las enzimas Péptido sintetetas no ribosomales, tales como PA4078, pueden sintetizar los CDPs, por lo que se extrajeron estas moléculas para su análisis.

Los extractos se analizaron en HPLC y con los cromatogramas resultantes se identificaron los CDPs. Se tomaron como referencia los tiempos de retención característicos de cada CDP y su patrón. El primer CDP es el Ciclo(L-Pro-L-Ile) con un tiempo de retención de 8.71 min, este CDP no se encuentra caracterizado con CG-MS, sin embargo, concuerda el tiempo de retención con el aminoácido Ile por lo que se propone que es dicho CDP. Seguimos con los CDPs ciclo(L-Pro-L-Tyr) a los 11.19 min, ciclo(L-Pro-L-Val) a los 11.94 min y finalmente ciclo(L-Pro-L-Phe) a los 12.63 min (Figura 23). Este patrón de picos y los tiempos de retención se observaron tanto en extractos de PAO1 como en la mutante PA4078::Gm. El desfase en los picos se explica por la adición de hidrógenos a la molécula.

Se cuantificó el área debajo de la curva de los picos de los CDPs para obtener la abundancia relativa de cada uno de ellos, con el objetivo de comparar la abundancia en la cepa silvestre PAO1 y la mutante PA4078::Gm. Se graficaron los resultados y se obtuvo lo siguiente: los CDPs ciclo(L-Pro-L-Ile) y ciclo(L-Pro-L-Tyr) mostraron una abundancia similar sin diferencias significativas entre PAO1 y PA4078::Gm; los CDPs ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) mostraron un aumento en su abundancia en las muestras de la mutante PA4078::Gm; sin embargo no se observó una diferencia estadísticamente significativa

(Figura 24), esto se observa mejor con Ciclo(L-Pro-L-Phe). Estos resultados sugieren que la producción de los CDPs en *P. aeruginosa* PAO1 no están directamente relacionados al ORF PA4078 y que no es esencial para su síntesis.

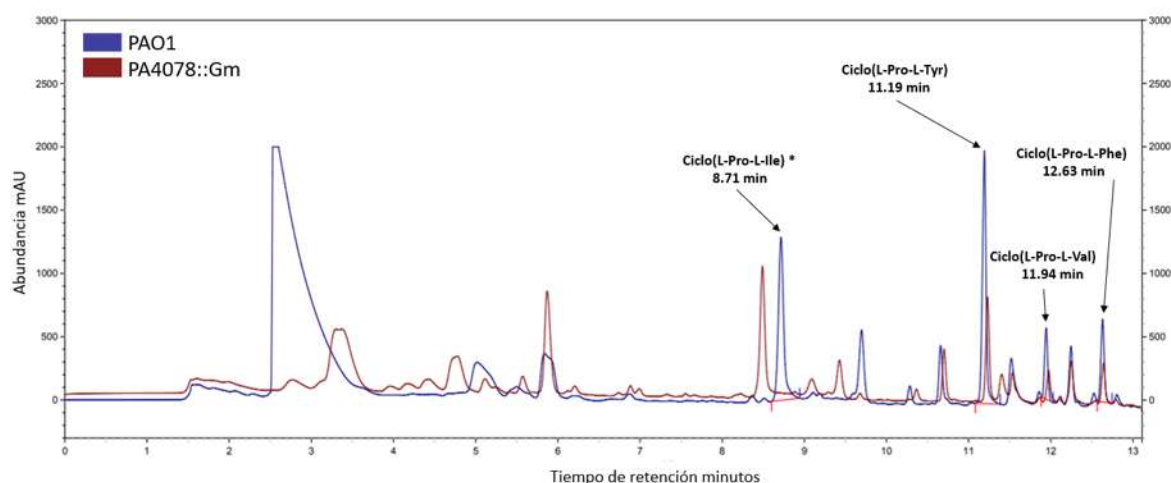


Figura 23. Cromatograma representativo del análisis en HPLC de los extractos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y PA4078::Gm. Con flechas se señalan los picos correspondientes a cada CDP y su tiempo de retención.

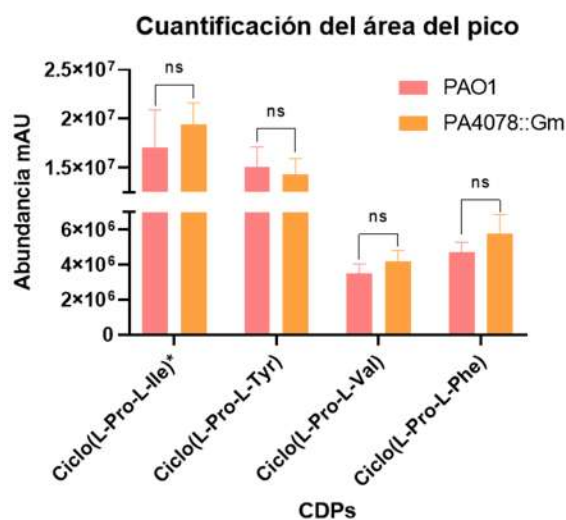


Figura 24. Gráfica de la abundancia de ciclodipéptidos extraídos de las cepas de *P. aeruginosa* en PAO1 y PA4078. Los datos representan tres ensayos, $n=3$. Análisis estadístico T-test para muestras independientes por grupos ($p \leq 0.05$). Las barras representan el Error Estándar.

8.5. Efecto de la mutación en PA4078 de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 sobre la producción de factores de virulencia.

Con el fin de evaluar si la mutación en PA4078 tiene un efecto sobre la virulencia de la bacteria, se cuantificaron algunos factores de virulencia producidos por *P. aeruginosa* regulados por los sistemas de Quorum sensing. Estos factores se dividen en dos grandes grupos: secretados y estructurales.

Las biopelículas son factores de virulencia esenciales que produce la bacteria, ya que le confiere adhesión a superficies y resistencia a antibióticos. Existen otros factores de virulencia que forman parte importante de la integridad de las biopelículas, los cuales son ramnolípidos y lipopolisacáridos. Los resultados muestran que comparado a la cepa silvestre PAO1, la producción tanto de biopelículas como ramnolípidos y lipopolisacáridos incrementó en la mutante PA4078::Gm (Figura 25). Como control negativo se utilizó la cepa JM2, la cual es una mutante doble en *lasI* y *rhII* ($\Delta lasI/\Delta rhII$) por lo que presenta un sistema de Quorum sensing deficiente, produce menos factores de virulencia y es menos virulenta.

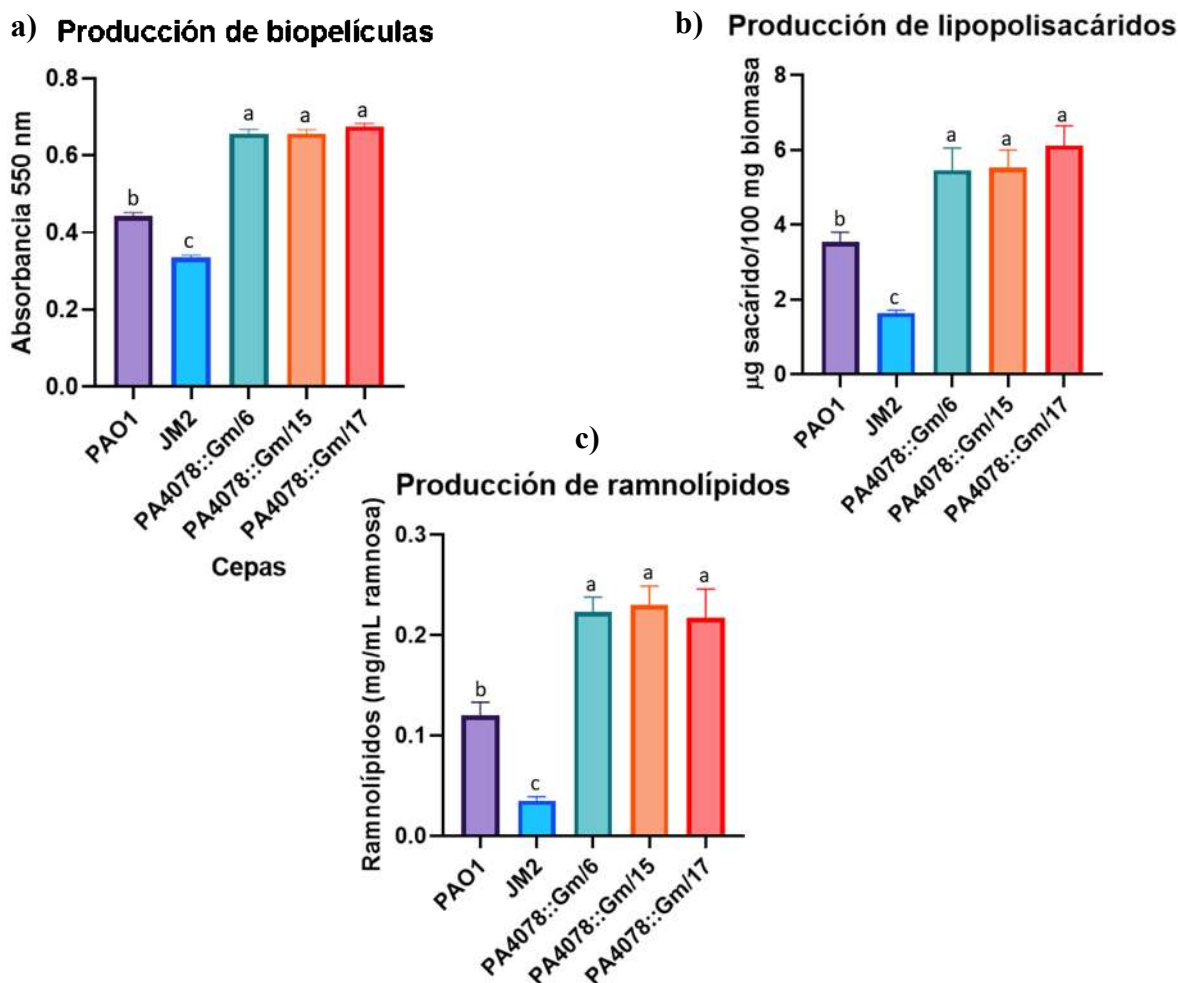


Figura 25. Cuantificación de a) biopelículas b) lipopolisacáridos c) ramnolípidos en las cepas de *P. aeruginosa*. Los datos representan tres ensayos, n=3. Análisis estadístico de ANOVA una vía. Las barras representan el Error Estándar. Diferentes letras denotan diferencias significativas, el análisis de las medias se realizó con post-hoc Tukey ($p \leq 0.05$).

Pseudomonas aeruginosa secreta varias proteínas que funcionan como factores de virulencia, entre ellas se encuentran la elastasa y las proteasas en general. Estas enzimas le facilitan a la bacteria la colonización del huésped ya que escinden proteínas o tejidos de defensa. Se cuantificó la abundancia de estas enzimas en los sobrenadantes de PAO1 y PA4078::Gm. En

el caso de la elastasa, hubo una mayor producción en la mutante comparada con la cepa silvestre. Sin embargo, en la producción de proteasas no hubo diferencias significativas, siendo que las proteasas presentes en el sobrenadante de las dos cepas tuvieron porcentajes de aclaramiento del medio adicionado con leche sin grasa similares (Figura 26).

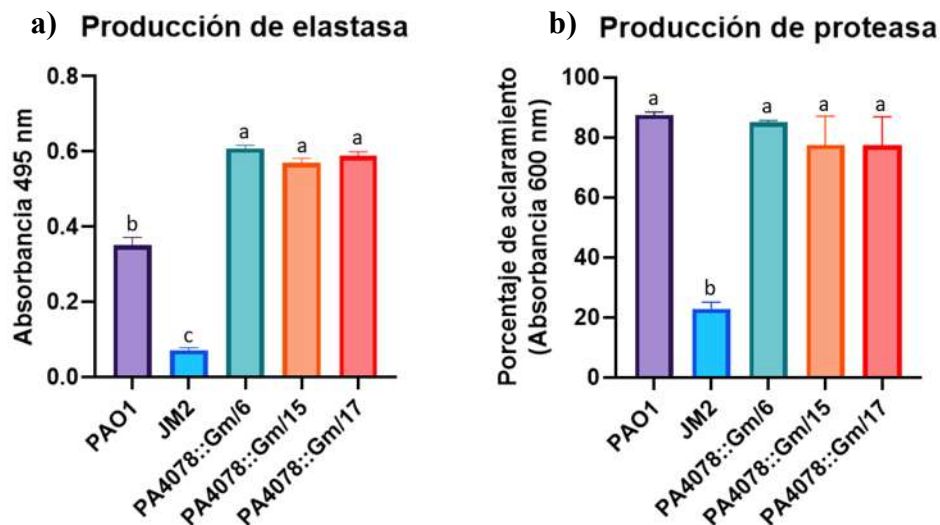


Figura 26. Determinación de enzimas **a)** elastasa **b)** proteasa en el sobrenadante de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y PA4078::Gm. Los datos representan tres ensayos, n=3. Análisis estadístico de ANOVA una vía. Las barras representan el Error Estándar. Diferentes letras denotan diferencias significativas, el análisis de las medias se realizó con post-hoc Tukey ($p \leq 0.05$).

De igual manera, se analizó la abundancia de los sideróforos en el sobrenadante de las cepas PAO1 y PA4078::Gm. La pioverdina, además de ser un sideróforo, también es un pigmento verde-amarillento que tiene la capacidad de emitir fluorescencia y le da el color característico a la bacteria (Figura 27). Los resultados muestran que no hay diferencias entre la producción de esta molécula entre la cepa silvestre y la mutante, emitiendo una fluorescencia similar. Por otro lado, la pioquelina es un sideróforo de menor importancia ya que tiene menos afinidad de unión al hierro. Su producción aumentó significativamente en la mutante PA4078::Gm en comparación a la cepa silvestre PAO1 (Figura 27). Los sideróforos son un factor de virulencia importante para *P. aeruginosa* en condiciones limitantes de hierro, ya que le confiere ventaja por sobre otros organismos al permitirle captar el hierro del medio de manera más eficiente.

Finalmente se evaluó la abundancia de la piocianina, esta es una molécula perteneciente a las fenazinas de un color azulado y es uno de los principales factores de virulencia producidos por *P. aeruginosa*. Se trata de una exotoxina que es indispensable en el proceso de infección ya que tiene la capacidad de inhibir a organismos competidores y provocar la muerte de las células pulmonares en pacientes con fibrosis quística. Al cuantificar la piocianina en los sobrenadantes de las cepas PAO1 y la mutante PA4078::Gm, se pudo observar una evidente disminución en la producción de este sideróforo en la mutante; sin embargo, dicha disminución no es comparable a aquella mostrada por el control negativo JM2 (Figura 28).

Es importante recalcar que la piocianina fue el único factor de virulencia que se encontró en menor cantidad en los sobrenadantes de la mutante PA4078::Gm comparado con PAO1.

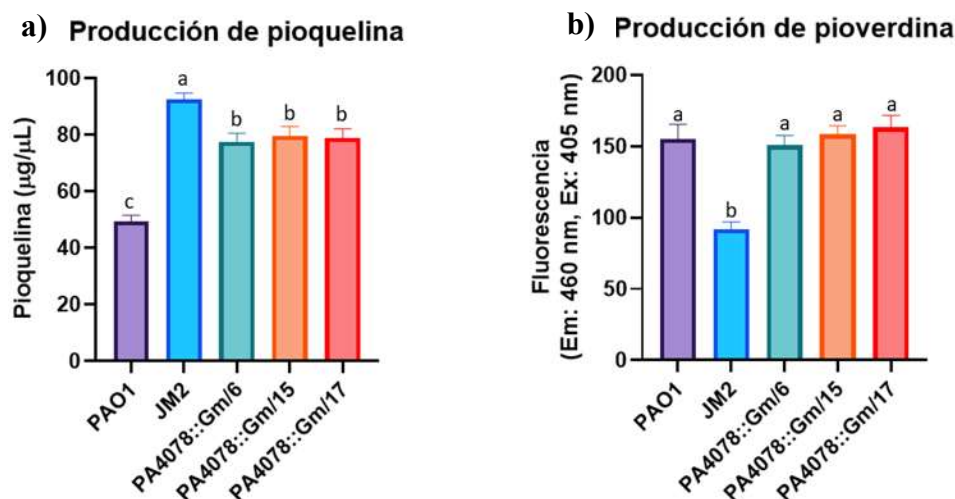


Figura 27. Cuantificación de sideróforos **a)** pioquelina **b)** pioverdina en el sobrenadante de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y PA4078::Gm. Los datos representan tres ensayos, n=3. Análisis estadístico de ANOVA una vía. Las barras representan el Error Estándar. Diferentes letras denotan diferencias significativas, el análisis de las medias se realizó con post-hoc Tukey ($p \leq 0.05$).

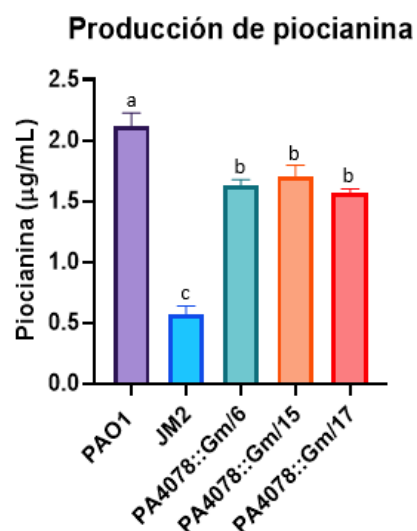


Figura 28. Cuantificación de piocianina de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y PA4078::Gm. Los datos representan tres ensayos, n=3. Análisis estadístico de ANOVA una vía. Las barras representan el Error Estándar. Diferentes letras denotan diferencias significativas, el análisis de las medias se realizó con post-hoc Tukey ($p \leq 0.05$).

8.6. Evaluación de la patogenicidad de la cepa PA4078::Gm de *Pseudomonas aeruginosa* en *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un organismo modelo con el cuál se han estudiado interacciones entre patógeno y hospedero *in vivo*. En los ensayos de patogenicidad se midió la supervivencia de los nematodos en dos condiciones diferentes: se incubaron con tratamientos

de sobrenadante libre de células y cultivo bacteriano, además se incluyó un control sin tratamiento (Medio). Los resultados de los ensayos muestran que las cepas tienen diferente efecto sobre la supervivencia de los nematodos. En el tratamiento con los sobrenadantes: la cepa JM2 al producir menor cantidad de factores de virulencia que PAO1 resultó menos virulenta, con porcentajes de supervivencia de 84.6% y 69.3%, a las 48 h de tratamiento, respectivamente. Por otro lado, los porcentajes de supervivencia de la mutante PA4078::Gm (66%) y PAO1 fueron similares, no mostrando diferencias significativas (Figura 29).

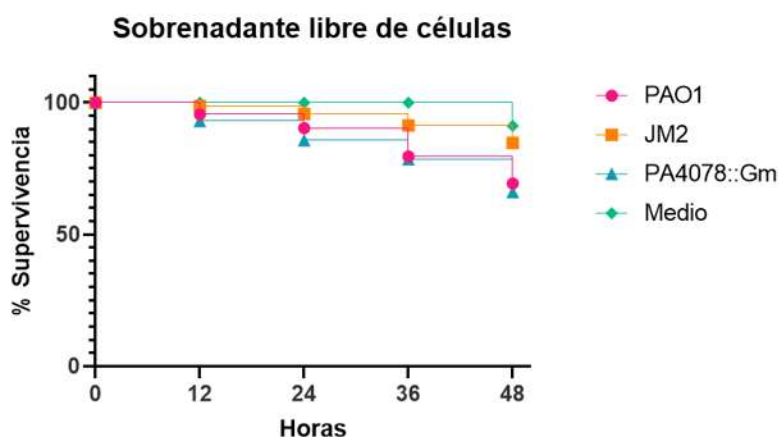


Figura 29. Curva de supervivencia de *C. elegans* tratados con sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1, JM2 y PA4078::Gm. Los datos representan tres ensayos, n=3. Las barras representan el Error Estándar.

Como se muestra en la figura 30, los tratamientos con los cultivos bacterianos mostraron un patrón similar en la supervivencia de los nematodos que el del tratamiento con sobrenadante; sin embargo, se observa un efecto más evidente. La cepa JM2 es la menos virulenta con un porcentaje de supervivencia de 81.5% a las 60 h de tratamiento, comparado con el control PAO1 y la mutante PA4078:Gm con sus porcentajes respectivos de 59.6% y 47.1%, siendo la mutante la cepa más virulenta. Este patrón comienza a notarse a partir de las 12 h de tratamiento con la mutante PA4078::Gm, la cual provoca muerte de los nematodos.

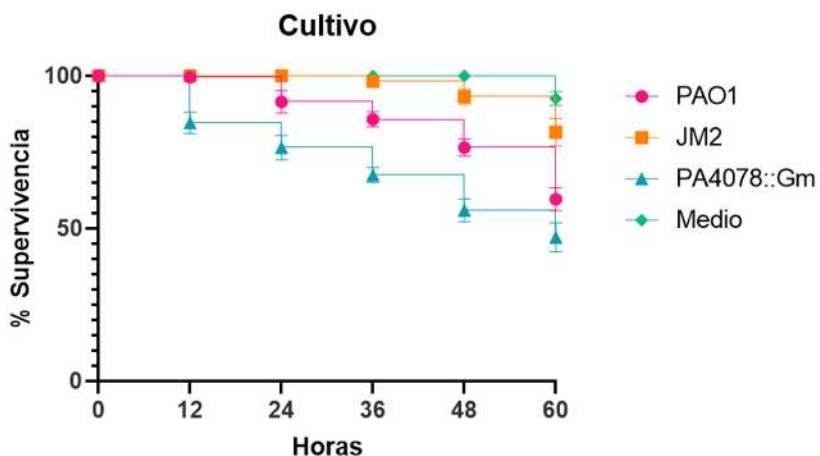


Figura 30. Curva de supervivencia de *C. elegans* tratados con cultivos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1, JM2 y PA4078::Gm. Los datos representan tres ensayos, n=3. Las barras representan el Error Estándar.

9. DISCUSIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que representa una gran amenaza a la salud pública, ya que es una bacteria multirresistente a antibióticos y provoca enfermedad a individuos inmunocomprometidos. Entender los factores que contribuyen a su adaptabilidad y patogenicidad es crucial para desarrollar estrategias que permitan tratar o prevenir las infecciones causadas por esta bacteria.

Los estudios sobre la virulencia de *P. aeruginosa* se han centrado en la regulación de sus sistemas de Quorum sensing (QS), ya que es el responsable de la producción de una gran cantidad de factores de virulencia como son las biopelículas, piocianina, elastasa, ramnolípidos, pioverdina, etc. En estos estudios se observa el efecto sobre la virulencia cuando alguno de sus sistemas se encuentra mutado. Se han encontrado un gran número de aislados ambientales y de pacientes de *P. aeruginosa* con el sistema Las mutado; sin embargo, su virulencia se mantiene ya que el sistema Rhl sobre produce algunos factores de virulencia. Por otro lado, una mutación en el sistema Rhl resulta en la poca o nula producción de varios factores de virulencia (Cocotl-Yañez *et al.*, 2020). Una doble mutación en Las/Rhl resulta en una disminución en la producción de factores de virulencia regulados por el QS y menor virulencia en modelos *in vivo*.

En paralelo se han estudiado moléculas con potencial anti-QS, entre ellas se encuentran los péptidos de tamaño pequeño como los ciclodipéptidos (CDPs), los cuales han mostrado que disminuyen la producción de biopelículas, piocianina, ramnolípidos, etc. (Taha *et al.*, 2019; Y. Wang *et al.*, 2022). Los CDPs tienen la capacidad de unirse al receptor transcripcional LasR, incluso con mayor afinidad que su ligando 3-oxo-C12-HSL, esto resultó en una disminución en la expresión de los genes *lasI*, *lasR*, *rhlI* y *rhlR* y en la producción de algunos factores de virulencia (Li *et al.*, 2023). A pesar de esto, hasta el momento no se sabe con exactitud la manera en la que estas moléculas interaccionan con el QS.

Por otro lado, los CDPs son moléculas producidas por una gran variedad de organismos y se ha demostrado que tienen diversas actividades biológicas, algunos ejemplos son: promotores del crecimiento vegetal, antimicrobianos, citotóxicos, entre otros. En *P. aeruginosa* se ha propuesto que estas moléculas son sintetizadas por Péptido sintetasas no ribosomales (NRPS), entre otras enzimas. En un trabajo por González y colaboradores en 2017, se identificaron por un ensayo bioinformático 10 genes que codifican para NRPS en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 (Tabla 1). Entre ellos el ORF PA4078 propuesto como posible NRPS. La función desconocida de este gen lo hace un candidato ideal para el estudio de los mecanismos involucrados en la producción de moléculas como los CDPs, los factores de virulencia y la regulación del QS.

Las NRPS desempeñan un papel vital en la síntesis de varios compuestos bioactivos en bacterias, tal es el caso de algunos factores de virulencia como la pioquelina. Este trabajo se centra en estudiar el papel de las NRPS en la patogenicidad de *P. aeruginosa* a través de

examinar la función del ORF PA4078 asociado con la producción de CDPs, factores de virulencia y su impacto en la virulencia de la bacteria.

En este trabajo se obtuvo una mutante en el ORF PA4078 por medio de interrupción génica con un cassette de resistencia a gentamicina y posteriormente se llevó a cabo la recombinación homóloga en *P. aeruginosa* PAO1 (Figura 14-18). La mutación se caracterizó por PCR (Figura 20). Se trabajó con tres clones de la mutante PA4078::Gm (6, 15, 17) seleccionadas por fenotipo (datos no mostrados).

Se identificaron cuatro ciclodipéptidos en el sobrenadante de PAO1 y PA4078::Gm por medio de HPLC (Figura 23). Los CDPs ciclo(L-Pro-L-Tyr) con un tiempo de retención de 11.19 min, ciclo(L-Pro-L-Val) 11.94 min y ciclo(L-Pro-L-Phe) 12.63 min, fueron caracterizados por medio de GC-MS anteriormente y está comprobado que se encuentran en un patrón específico. Estos CDPs también fueron identificados con anterioridad en el grupo de trabajo en sobrenadantes de PAO1 y mutantes sencillas y dobles en NRPS (González *et al.*, 2017; Solís-Ortíz, 2017). En el trabajo de González y colaboradores se reportó un cuarto ciclodipéptido ciclo(L-Pro-L-Leu), el cual no se logró detectar en el presente trabajo; sin embargo, se propone el ciclodipéptido ciclo(L-Pro-L-Ile) con un tiempo de retención de 8.71 min. Se propuso de acuerdo al tiempo de retención de la Ile, en un estudio posterior es necesario identificar este posible CDP con GC-MS y considerarlo como un componente de la mezcla de CDPs que produce *P. aeruginosa* PAO1.

La abundancia de los CDPs se calculó con el área debajo de la curva de los picos correspondientes a cada ciclodipéptido (Figura 24). Sorprendentemente no se encontraron diferencias significativas entre la producción de los CDPs entre PAO1 y PA4078::Gm. Este resultado es contrario a lo que reporta González y colaboradores donde una mutante por transposón en el ORF PA4078 produjo una mayor cantidad de Ciclo(L-Pro-L-Tyr) y Ciclo(L-Pro-L-Phe). Esto se puede atribuir a que en el presente trabajo se estandarizó la extracción de CDPs ya que con el método anterior se observaban resultados variables entre repeticiones en la misma cepa, debido a la diferencia en la intensidad de agitación en las repeticiones. Con una agitación homogénea no manual se obtuvieron datos homogéneos.

En el trabajo de Solís-Ortíz se cuantificaron los CDPs del sobrenadante de mutantes dobles en varios genes que codifican para NRPS. En el caso del CDP ciclo(L-Pro-L-Tyr) las combinaciones PA4078/PvdL, PA4078/PA2402, PA4078/PchF y PA4078/PvdJ produjeron una mayor cantidad de este ciclodipéptido en comparación a PAO1. Con ciclo(L-Pro-L-Val), las cepas PA4078/PchF, PA4078/PA2402 y PA4078/PvdJ produjeron una menor cantidad del CDP, y, por el contrario, la cepa PA4078/PvdL produjo más que PAO1. En referencia al ciclo(L-Pro-L-Phe), la mutante PA4078/PA2402 produjo una menor cantidad del CDP al contrario de PA4078/PchF que produjo mayor cantidad que la cepa silvestre. Al observar que una mutación sencilla en un NRPS, como el ORF PA4078, no es significativa en la producción de CDPs, pero al mutar dos NRPS ya se observan diferencias significativas ya sea al alza o a la baja, podemos especular que la producción de estas moléculas no es

específica a una sola enzima. Debido a la redundancia genética de las NRPS, al mutar un solo gen no se ve afectada la producción, y las otras enzimas se encargan de sintetizar las moléculas en niveles normales, pero al mutar dos o más genes es cuando se presenta el desbalance en la producción de CDPs, como reporta Solís-Ortíz. Existe la posibilidad de que los CDPs sean un producto secundario de otras vías de síntesis, ya que los genes *pchF*, *pvdL* y *pvdJ* codifican para NRPS involucradas en la síntesis de pioquelina y pioverdina.

La producción de biopelícula es esencial para la virulencia de la bacteria ya que le confiere adherencia a superficies bióticas y abióticas, así como protección contra antibióticos. Así mismo, su producción es estimulada por el comportamiento en grupo desencadenada por el Quorum sensing. Para la estabilidad e integridad de las biopelículas se necesita la producción de lipopolisacáridos y ramnolípidos que también son factores de virulencia regulados por el QS. La cuantificación de estos factores de virulencia muestra que la mutante PA4078::Gm produce una mayor cantidad de biopelículas, ramnolípidos y lipopolisacáridos en comparación a PAO1 (Figura 25). Se ha reportado que al mutar los genes que codifican para las NRPS responsables de la síntesis de pioverdina (*pvdJ*, *pvdL* y *pvdI*) también se modifica la estructura de las biopelículas, así como su producción. $\Delta pvdL$ y $\Delta pvdI$ produjeron menor cantidad de biopelículas, por el contrario, las tres mutantes sencillas en las NRPS produjeron mayor cantidad de ramnolípidos que la cepa silvestre PAO1 (Díaz-Pérez *et al.*, 2022).

La mutante PA4078::Gm produjo una mayor cantidad de la enzima elastasa comparada a la cepa silvestre; por otro lado, no presentó diferencias significativas en la producción de proteasas (Figura 26). La producción de proteasa alcalina regulada por el QS; sin embargo, en este trabajo se cuantificaron las proteasas totales, por lo que podemos inferir que la producción de las proteasas en general no se ve afectada al haber cambios en la regulación del QS. Estas enzimas son clave para la patogenicidad de la bacteria, ya que le permiten evadir la respuesta inmune del hospedero, participan en facilitar la adquisición de recursos y en la invasión inicial. En nuestro grupo de trabajo se describió que las mutantes $\Delta pvdJ$, $\Delta pvdL$ y $\Delta pvdI$ no presentaron diferencias significativas en su producción en comparación a PAO1 (Díaz-Pérez *et al.*, 2022).

Pseudomonas aeruginosa posee un arsenal de mecanismos adaptativos que le permiten colonizar una gran variedad de nichos. Entre esos mecanismos se encuentra la producción de moléculas que le permitan aprovechar nutrientes del medio, esto le confiere una ventaja por sobre otros microorganismos. Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro. *P. aeruginosa* produce dos sideróforos: la pioverdina que es un pigmento fluorescente de color verde amarillento (uno de los compuestos responsables del color verde característico de *P. aeruginosa*), y tiene una gran afinidad por el hierro por lo que es el principal sideróforo producido por la bacteria; y la pioquelina que tiene menor afinidad por el hierro. La bacteria produce principalmente pioquelina y solo en condiciones muy limitantes de hierro produce más cantidad de pioverdina. La cepa PA4078::Gm produjo una mayor cantidad de pioquelina

que la cepa PAO1 (en condiciones normales), en cuanto a la producción de pioverdina no hubo diferencias significativas entre las dos cepas (Figura 27).

Interesantemente, el único factor de virulencia medido en este trabajo que su producción se vio disminuida en su producción respecto a la cepa silvestre fue la piocianina (Figura 28). Esta molécula forma parte del grupo de las fenazinas, presenta un color azulado (pigmento que conjunto a la pioverdina le dan el color característico a la bacteria) y se le han atribuido propiedades tóxicas. Recientemente se ha reportado que la piocianina es crucial en los procesos infecciosos de *P. aeruginosa* y su producción es regulada por los reguladores transcripcionales RhIR y pqsR del Quorum sensing. De modo contrario hemos descrito que las mutantes en NRPS involucradas en la síntesis de pioverdina produjeron una mayor cantidad de piocianina que PAO1 (Díaz-Pérez et al., 2022). Es de interés, investigar más a fondo el papel del ORF PA4078 en la producción de piocianina, ya que fue el factor de virulencia que disminuyó su producción.

Al observar que la producción de varios factores de virulencia aumentaron en PA4078::Gm en comparación a PAO1, se llevó a cabo un ensayo de virulencia en el organismo modelo *C. elegans*, con la finalidad de observar si en un modelo *in vivo* se ve modificada la patogenicidad de la bacteria. Inicialmente se hizo un ensayo en el que los nematodos fueron tratados con el sobrenadante filtrado de cultivos de 48 h de cada cepa. Los resultados arrojan que se presenta en general un porcentaje alto de supervivencia de los nematodos en todas las cepas: el sobrenadante de la doble mutante y control negativo $\Delta lasI/\Delta rhII$ fue la cepa menos virulenta como era de esperarse; los sobrenadantes de la cepa silvestre PAO1 y la mutante PA4078::Gm presentaron un patrón de virulencia similar, siendo la mutante ligeramente pero no significativo, más virulenta (Figura 29). La poca virulencia de los sobrenadantes se puede atribuir a que éstos están filtrados y libres de células bacterianas. Los nematodos son individuos sanos por lo que los factores de virulencia secretados en el sobrenadante no tienen la capacidad de causar daño a un individuo sano por si solos. En investigaciones futuras se propondría trabajar con un organismo que permita realizar una herida y observar el efecto del sobrenadante libre de células en la supervivencia.

Finalmente se realizó un ensayo utilizando cultivos bacterianos de 48 h de crecimiento como tratamiento en una población de *C. elegans* y se monitoreo la supervivencia de estos en un periodo de 60 h. Como era de esperarse, nuevamente el cultivo de $\Delta lasI/\Delta rhII$ tuvo el mayor porcentaje de supervivencia con 81.5% a las 60 h, y fue hasta las 36 h de tratamiento que se observó muerte de los nematodos. La cepa silvestre PAO1 presentó un porcentaje de supervivencia de 59.6% a las 60 h y se comenzó a observar la muerte de los individuos a partir de las 24 h de tratamiento. Siguiendo la tendencia, el cultivo de la mutante PA4078::Gm fue el más virulento con un porcentaje de supervivencia de 47.1% a las 60 h de tratamiento y la muerte de *C. elegans* se observó a las primeras 12 h (Figura 30). Es contundente que la mutación en el ORF PA4078 provocó una mayor virulencia comparada con PAO1, además la patogenicidad se observa de manera más rápida que las otras dos cepas.

La muerte de los nematodos se puede atribuir con totalidad a las cepas de cada tratamiento, ya que se colocó un control con solo medio M9 donde los nematodos presentaban un comportamiento normal y hasta las 60 h se presentó la muerte de nematodos, la cual es muy insignificante comparada a los tratamientos.

El ensayo de virulencia *in vivo* con *C. elegans* reportado por Díaz-Pérez y colaboradores muestra que las mutantes sencillas en los NRPS $\Delta pvdJ$, $\Delta pvdL$ y $\Delta pvdI$ presentan un porcentaje de supervivencia mayor al de PAO1, significando en una menor virulencia (Díaz-Pérez et al., 2022). La producción de las biopelículas y pioquelina se vio disminuida, así como hubo una menor producción de los auto inductores de tipo acil-homoserina lactona, y también se detectó una expresión menor de los genes *lasI* y *pqsA*, estos genes forman parte de los sistemas de Quorum sensing de *P. aeruginosa*. Estos datos muestran que las NRPS están implicadas en la virulencia de la bacteria de manera multifactorial. Al verse disminuida la producción de algunos factores de virulencia claves por una mutación como son las biopelículas y una actividad de QS deficiente, las bacterias serán menos virulentas. Por el contrario, si estos factores de virulencia se producen en mayores cantidades, se espera que esta bacteria sea más virulenta, tal es el caso de la mutante PA4078::Gm.

Este estudio contribuye a nuestro entendimiento acerca del papel del ORF PA4078, que está propuesto como posible NRPS, en la patogenicidad de *P. aeruginosa*, enfatizando en la caracterización de genes implicados en la producción de factores de virulencia. Estos resultados ofrecen información valiosa para el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas para mitigar las infecciones por *P. aeruginosa* en personas inmunocomprometidas.

10. PERSPECTIVAS

Es necesario profundizar el estudio del ORF PA4078 para determinar su función, dilucidar el tipo de molécula que sintetiza y la manera en la que participa en la virulencia de la bacteria. Se proponen algunas perspectivas respecto a este proyecto y línea de investigación las cuales son: utilizar el gen clonado en *E. coli* que se obtuvo en el presente trabajo para caracterizar su función al obtener cepas de *P. aeruginosa* sobreexpresantes del gen y complementar la mutante PA4078::Gm. Continuar investigando en esta área de la ciencia nos permitirá obtener una mejor comprensión de las complicadas interacciones entre patógenos y hospederos, la producción de factores de virulencia y la respuesta del hospedero hacia las bacterias patógenas como *P. aeruginosa*.

11. CONCLUSIÓN

El ORF PA4078 está implicado en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ya que una mutación por interrupción génica en éste ORF, que codifica para una probable NRPS, incrementó la producción de biopelículas, ramnolípidos, lipopolisacáridos, elastasa y pioquelina. No se observaron diferencias significativas en la producción de ciclodipéptidos, pero causó disminución de piocianina. Esta mutación provocó un aumento en la virulencia y patogenicidad de *P. aeruginosa* PAO1 en un modelo *in vivo* de *C. elegans*.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Abisado, R. G., Benomar, S., Klaus, J. R., Dandekar, A. A., & Chandler, J. R. (2018). Bacterial Quorum Sensing and Microbial Community Interactions. *mBio*, 9(3), e02331-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02331-17>
- Ahator, S. D., & Zhang, L. (2019b). Small Is Mighty—Chemical Communication Systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 559-578. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120044>
- Ahmed, S. A. K. S., Rudden, M., Smyth, T. J., Dooley, J. S. G., Marchant, R., & Banat, I. M. (2019). Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(8), 3521-3535. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09618-0>
- Alatraktchi, F. A., Svendsen, W. E., & Molin, S. (2020). Electrochemical Detection of Pyocyanin as a Biomarker for *Pseudomonas aeruginosa*: A Focused Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 20(18), 5218. <https://doi.org/10.3390/s20185218>
- Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N., & Croughan, T. P. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene*, 160(1), 63-67. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00108-I](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00108-I)
- Ali, H., Ries, M. I., Lankhorst, P. P., Hoeven, R. A. M. van der, Schouten, O. L., Noga, M., Hankemeier, T., Peij, N. N. M. E. van, Bovenberg, R. A. L., Vreeken, R. J., & Driessen, A. J. M. (2014). A Non-Canonical NRPS Is Involved in the Synthesis of Fungisporin and Related Hydrophobic Cyclic Tetrapeptides in *Penicillium chrysogenum*. *PLOS ONE*, 9(6), e98212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098212>
- Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350-359. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>
- Ben Haj Khalifa, A., Moissenet, D., Vu Thien, H., & Khedher, M. (2011). Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: Mechanisms and modes of regulation. *Annales de biologie clinique*, 69(4), 393-403. <https://doi.org/10.1684/abc.2011.0589>
- Bonhomme, S., Dessen, A., & Macheboeuf, P. (2021). The inherent flexibility of type I non-ribosomal peptide synthetase multienzymes drives their catalytic activities. *Open Biology*, 11(5), 200386. <https://doi.org/10.1098/rsob.200386>
- Brenner, S. (1974). THE GENETICS OF *CAENORHABDITIS ELEGANS*. *Genetics*, 77(1), 71-94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- Brimacombe, C. A., & Beatty, J. T. (2013). *Surface Polysaccharide Extraction and Quantification*. 3(20). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.934>

- Brown, A. S., Calcott, M. J., Owen, J. G., & Ackerley, D. F. (2018). Structural, functional and evolutionary perspectives on effective re-engineering of non-ribosomal peptide synthetase assembly lines. *Natural Product Reports*, 35(11), 1210-1228. <https://doi.org/10.1039/C8NP00036K>
- Çakmak, H., Güngörmedi, G., Dikmen, G., Çelik, P. A., & Çabuk, A. (2017). The true methodology for rhamnolipid: Various solvents affect rhamnolipid characteristics. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(10), 1700002. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700002>
- Cocotl-Yañez, M., Soto-Aceves, M. P., González-Valdez, A., Servín-González, L., & Soberón-Chávez, G. (2020). Virulence factors regulation by the quorum-sensing and Rsm systems in the marine strain *Pseudomonas aeruginosa* ID4365, a natural mutant in lasR. *FEMS Microbiology Letters*, 367(12), fnaa092. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa092>
- Coffey, B. M., & Anderson, G. G. (2014). Biofilm Formation in the 96-Well Microtiter Plate. En *Pseudomonas Methods and Protocols* (pp. 631-641). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_48
- Cornelis, P. (2019). Putting an end to the *Pseudomonas aeruginosa* IQS controversy. *MicrobiologyOpen*, 9(2), e962. <https://doi.org/10.1002/mbo3.962>
- Cornelis, P., & Dingemans, J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 75. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00075>
- Defoirdt, T. (2018). Quorum-Sensing Systems as Targets for Antivirulence Therapy. *Trends in Microbiology*, 26(4), 313-328. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.10.005>
- Díaz-Pérez, S. P., Solis, C. S., López-Bucio, J. S., Valdez Alarcón, J. J., Villegas, J., Reyes-De la Cruz, H., & Campos-Garcia, J. (2022). Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine and Pyocyanin Siderophores by Quorum Sensing Modulation. *Microbial Ecology*, 86(1), 727-741. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02095-5>
- Everett, M. J., & Davies, D. T. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* elastase (LasB) as a therapeutic target. *Drug Discovery Today*, 26(9), 2108-2123. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.02.026>
- Figurski, D. H., & Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1648-1652. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1648>
- Fila, G., Kawiak, A., & Grinholc, M. S. (2017). Blue light treatment of *Pseudomonas aeruginosa*: Strong bactericidal activity, synergism with antibiotics and inactivation of virulence factors. *Virulence*, 8(6), 938-958. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1250995>

- Frank, D. (2012). Research Topic on *Pseudomonas aeruginosa*, Biology, Genetics, and Host–Pathogen Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00020>
- González, O., Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A. L., Magaña-Dueñas, V., López-Bucio, J., & Campos-García, J. (2017). Non-ribosomal Peptide Synthases from *Pseudomonas aeruginosa* Play a Role in Cyclodipeptide Biosynthesis, Quorum-Sensing Regulation, and Root Development in a Plant Host. *Microbial Ecology*, 73(3), 616-629. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0896-4>
- Grünewald, J., & Marahiel, M. A. (2006). Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 70(1), 121-146. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.121-146.2006>
- Gulick, A. M. (2017). Nonribosomal Peptide Synthetase Biosynthetic Clusters of ESKAPE Pathogens. *Natural product reports*, 34(8), 981-1009. <https://doi.org/10.1039/c7np00029d>
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D., & Grant, G. D. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), 236. <https://doi.org/10.3390/toxins8080236>
- Hernández-Padilla, L., Vázquez-Rivera, D., Sánchez-Briones, L. A., Díaz-Pérez, A. L., Moreno-Rodríguez, J., Moreno-Eutimio, M. A., Meza-Carmen, V., Reyes-De la Cruz, H., & Campos-García, J. (2017). The Antiproliferative Effect of Cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on HeLa Cells Involves Inhibition of Phosphorylation of Akt and S6k Kinases. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 22(6), 1024. <https://doi.org/10.3390/molecules22061024>
- Hoegy, F., Mislin, G. L. A., & Schalk, I. J. (2014). Pyoverdine and Pyochelin Measurements. En A. Filloux & J.-L. Ramos (Eds.), *Pseudomonas Methods and Protocols* (Vol. 1149, pp. 293-301). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_24
- Höfte, M., Buysens, S., Koedam, N., & Cornelis, P. (1993). Zinc affects siderophore-mediated high affinity iron uptake systems in the rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Biometals*, 6(2), 85-91. <https://doi.org/10.1007/BF00140108>
- Hong, Z., Bolard, A., Giraud, C., Prévost, S., Genta-Jouve, G., Deregnaucourt, C., Häussler, S., Jeannot, K., & Li, Y. (2019). Azetidine-Containing Alkaloids Produced by a Quorum-Sensing Regulated Nonribosomal Peptide Synthetase Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(10), 3178-3182. <https://doi.org/10.1002/anie.201809981>
- Huang, Y., Chen, Y., & Zhang, L. (2020). The Roles of Microbial Cell-Cell Chemical Communication Systems in the Modulation of Antimicrobial Resistance. *Antibiotics*, 9(11), 779. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110779>

- Iiyama, K., Takahashi, E., Lee, J. M., Mon, H., Morishita, M., Kusakabe, T., & Yasunaga-Aoki, C. (2017). Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 364(7), fnx051. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx051>
- Izoré, T., Candace Ho, Y. T., Kaczmariski, J. A., Gavriilidou, A., Chow, K. H., Steer, D. L., Goode, R. J. A., Schittenhelm, R. B., Tailhades, J., Tosin, M., Challis, G. L., Krenske, E. H., Ziemert, N., Jackson, C. J., & Cryle, M. J. (2021). Structures of a non-ribosomal peptide synthetase condensation domain suggest the basis of substrate selectivity. *Nature Communications*, 12, 2511. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22623-0>
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., & McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3128. <https://doi.org/10.3390/ijms22063128>
- Klockgether, J., Cramer, N., Wiehlmann, L., Davenport, C., & Tümmeler, B. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2011.00150>
- Köhler, T., Ouertatani-Sakouhi, H., Cosson, P., & Delden, C. van. (2014). QsrO a Novel Regulator of Quorum-Sensing and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE*, 9(2), e87814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087814>
- Kokotek, W., & Lotz, W. (1991). Construction of a mobilizable cloning vector for site-directed mutagenesis of Gram-negative bacteria: Application to *Rhizobium leguminosarum*. *Gene*, 98(1), 7-13. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90097-U](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90097-U)
- LaSarre, B., & Federle, M. J. (2013). Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 77(1), 73-111. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00046-12>
- Latifi, A., Foglino, M., Tanaka, K., Williams, P., & Lazdunski, A. (1996). A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Molecular Microbiology*, 21(6), 1137-1146. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.00063.x>
- Latino, L., Caroff, M., & Pourcel, C. 2017. (2017). Fine structure analysis of lipopolysaccharides in bacteriophage-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mutants. *Microbiology*, 163(6), 848-855. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000476>
- Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., Chang, C., Dong, Y., Williams, P., & Zhang, L.-H. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature Chemical Biology*, 9(5), 339-343. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1225>
- Lee, J., & Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & Cell*, 6(1), 26-41. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x>

- Li, L., Xu, Z., Cao, R., Li, J., Wu, C.-J., Wang, Y., & Zhu, H. (2023). Effects of hydroxyl group in cyclo(Pro-Tyr)-like cyclic dipeptides on their anti-QS activity and self-assembly. *IScience*, 26(7). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107048>
- Martínez-Núñez, M. A., & López, V. E. L. y. (2016). Nonribosomal peptides synthetases and their applications in industry. *Sustainable Chemical Processes*, 4(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40508-016-0057-6>
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2017.00039>
- Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature reviews. Microbiology*, 17(6), 371-382. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5>
- O'Loughlin, C. T., Miller, L. C., Siryaporn, A., Drescher, K., Semmelhack, M. F., & Bassler, B. L. (2013). A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(44), 17981-17986. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316981110>
- Ortiz-Castro, R., Pelagio-Flores, R., Méndez-Bravo, A., Ruiz-Herrera, L. F., Campos-García, J., & López-Bucio, J. (2014). Pyocyanin, a virulence factor produced by *Pseudomonas aeruginosa*, alters root development through reactive oxygen species and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 27(4), 364-378. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-13-0219-R>
- Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews. Microbiology*, 14(9), 576-588. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89>
- Perraud, Q., Cantero, P., Roche, B., Gasser, V., Normant, V. P., Kuhn, L., Hammann, P., Mislin, G. L. A., Ehret-Sabatier, L., & Schalk, I. J. (2020). Phenotypic Adaption of *Pseudomonas aeruginosa* by Hacking Siderophores Produced by Other Microorganisms. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 19(4), 589-607. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001829>
- Poole, K. (2011). *Pseudomonas Aeruginosa*: Resistance to the Max. *Frontiers in Microbiology*, 2, 65. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00065>
- Reis, R. S., Pereira, A. G., Neves, B. C., & Freire, D. M. G. (2011). Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa* – A review. *Bioresource Technology*, 102(11), 6377-6384. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.074>
- Saleh, M. M., Abbas, H. A., & Askoura, M. M. (2019). Repositioning secnidazole as a novel virulence factors attenuating agent in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*, 127, 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.042>

Solís-Ortíz, C. S. (2017). *Estudio mutagénico de los genes involucrados en la biosíntesis de ciclodipeptidos en Pseudomonas aeruginosa PAO1* [Maestría, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo].

http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/3950

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., ... Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), Art. 6799. <https://doi.org/10.1038/35023079>

Taha, M. N., Saafan, A. E., Ahmedy, A., El Gebaly, E., & Khairalla, A. S. (2019). Two novel synthetic peptides inhibit quorum sensing-dependent biofilm formation and some virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 57(7), 618-625. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8548-2>

Veetilvalappil, V. V., Manuel, A., Aranjani, J. M., Tawale, R., & Koteshwara, A. (2022). Pathogenic arsenal of *Pseudomonas aeruginosa*: An update on virulence factors. *Future Microbiology*, 17, 465-481. <https://doi.org/10.2217/fmb-2021-0158>

Wang, S., Xiang, D., Tian, F., & Ni, M. (2021). Lipopolysaccharide from biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 induces macrophage hyperinflammatory responses. *Journal of Medical Microbiology*, 70(4), 001352. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001352>

Wang, Y., Zheng, Q., Li, L., Pan, L., & Zhu, H. (2022). Anti-Quorum-Sensing Activity of Tryptophan-Containing Cyclic Dipeptides. *Marine Drugs*, 20(2), 85. <https://doi.org/10.3390/md20020085>

West, S. E. H., Schweizer, H. P., Dall, C., Sample, A. K., & Runyen-Janecky, L. J. (1994). Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, 148(1), 81-86. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90237-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90237-2)

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1), 103-119. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(85\)90120-9](https://doi.org/10.1016/0378-1119(85)90120-9)

Zhao, F., Yuan, M., Lei, L., Li, C., & Xu, X. (2021). Enhanced production of monorhamnolipid in *Pseudomonas aeruginosa* and application potential in agriculture and petroleum industry. *Bioresource Technology*, 323, 124605. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124605>