

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS



“Participación de los ORFs PA2305/*ambB* y PA3327 en la virulencia
de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

LIC. XIMENA HERNÁNDEZ RAMOS

ASESOR:

DR. JESÚS CAMPOS GARCÍA

Morelia, Michoacán, noviembre 2023.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por el apoyo incondicional.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al CONAHCyT por el apoyo económico.

Al Dr. Jesús Campos García por el asesoramiento y su paciencia durante este proyecto.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Biotecnología Microbiana: Lore, Alma, Xoch, Lau, Rox, Kari, Marlene y Adrián por las risas, y apoyo en todo momento.

A Carlita, gracias por vivir este proceso conmigo y compartir nuestras teorías descabelladas. Sin ti no hubiera sobrevivido, gracias por ser mi otra neurona y todas las aventuras que vivimos.

DEDICATORIA

Con infinito cariño y profunda gratitud, dedico este trabajo a mis padres, que me han dado una maravillosa vida y motivado a siempre seguir mis sueños. Este trabajo es un tributo a ustedes, a su sacrificio y a su deseo inquebrantable de verme triunfar. Cada página escrita es un reflejo de la educación, los valores y el amor que me han brindado a lo largo de los años. Gracias por ser mis padres, mis maestros y mi ejemplo a seguir.

A mi hermano Toto y a mi hermana Estela que son mis compañeros en esta vida y compartiremos nuestros logros para siempre.

A mi novio Antuan que está a mi lado, motivándome y compartiendo alegrías y desafíos. Eres mi fuente de inspiración, y el amor que me das me ha guiado para siempre dar lo mejor de mí, gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.1.2. Importancia clínica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.2. Factores de virulencia	11
1.2.1. Biopelículas	12
1.2.2. Flagelo y pili	13
1.2.3. Lipopolisacáridos	14
1.2.4. Sistemas de secreción de proteínas	14
1.2.5. Proteínas efectoras	15
1.2.6. Enzimas proteolíticas	16
1.2.7. Ramnolípidos	16
1.2.8. Sideróforos	18
1.2.9. Piocianina	20
1.3. Quorum sensing	21
1.3.1. Quorum sensing de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
1.4. Péptido sintetasa no ribosomales (NRPS)	25
1.4.1. Dominio A	27
1.4.2. Dominio PCP	27
1.4.3. Dominio C	28
1.4.4. Dominio TE	28
1.5. NRPS en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
1.5.1. NRPS AmbB	29
1.6. Ciclodipéptidos (CDPs)	30
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. HIPÓTESIS	35
5. OBJETIVOS	36
5.1. Objetivo general	36
5.1.2. Objetivos específicos	36
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
7. MATERIALES Y MÉTODOS	39
7.1. Materiales	39
7.2. Métodos	42
8. RESULTADOS	54
8.1. Construcciones para la obtención de mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en el ORF PA2305/ <i>ambB</i>	54
8.2. Construcciones para la obtención de la mutante en el ORF PA3327 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	63
8.3. Efecto sobre la producción de factores de virulencia por mutación en las NRPS de <i>P. aeruginosa</i>	69
8.4. Efecto sobre la producción de CDPs por la mutación en NRPS de <i>P. aeruginosa</i>	74
8.5. Efecto de la mutación de NRPS de <i>P. aeruginosa</i> sobre el modelo <i>in vivo</i> <i>Caenorhabditis elegans</i>	77
9. DISCUSIÓN	79

10. CONCLUSIÓN.....	84
Referencias.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes factores de virulencia producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
Figura 2. Etapas de la formación de biopelículas microbianas	13
Figura 3. Estructura química de los rhamnolípidos producidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . 17	
Figura 4. (A) estructura de PVD1 producida por <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (B) secuencia de las cadenas peptídicas de PVDI, II y III.....	19
Figura 5. Estructura de la pioquelina producida por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Figura 6. Estructura química de la piocianina producida por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Figura 7. Sistema general de quorum sensing bacteriano.	22
Figura 8. Sistema canónico de QS y diversidad de moléculas AI..	23
Figura 9. Red jerárquica de los cuatro sistemas de QS de <i>P. aeruginosa</i>	24
Figura 10. Diagrama general de un modulo de NRPS y sus dominios generales.....	26
Figura 11. Línea de ensamblaje de la NRPS para el dodecapéptido cíclico ramificado, bacitracina, sintetizado por <i>Bacillus subtilis</i>	26
Figura 12. Reacción catalizada por el dominio A.	27
Figura 13. Reacción catalizada por el dominio PCP..	28
Figura 14. Reacción catalizada por el dominio C.	28
Figura 15. Ciclodipéptidos moduladores de proteínas tipo LuxR.	30
Figura 16. Sistema interconectado de QS en <i>P. aeruginosa</i>	32
Figura 17. Oligonucleótidos diseñados para amplificación de fragmento interno de 1.2 kb del gen <i>ambB</i> de 3.7 kb.....	54
Figura 18. Purificación del fragmento interno de 1.2 kb del gen <i>ambB</i>	54
Figura 19. Clonación del fragmento de 1.2 kb del gen <i>ambB</i> en el vector pGEM-t Easy.....	55
Figura 20. Verificación de inserción del fragmento en el vector p-GEM-t easy.	55
Figura 21. Obtención del cassette de resistencia a gentamicina con la enzima MluI.	56
Figura 22. Ligación del cassette de resistencia a gentamicina y la construcción pGEM-t- <i>ambB</i> para obtener la construcción pGEM-t- <i>ambB</i> ::Gm.....	57
Figura 23. Linealización del plásmido pKOK4 con la enzima EcoRI.	58
Figura 24. Análisis de restricción de la construcción pGEM-t- <i>ambB</i> ::Gm.....	58
Figura 25. Subclonación de <i>ambB</i> ::Gm en pKOK4..	59
Figura 26. Cultivo de de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en medio mínimo M9, fuente de carbono citranelol.	60
Figura 27. Amplificación del cassette de resistencia a Gm en el ORF PA2305/ <i>ambB</i>	60
Figura 28. Diagrama de <i>ambB</i> ::Gm.....	61
Figura 29. Comprobación de inserción de cassette de resistencia a Gm en el ORF PA2305/ <i>ambB</i>	61

Figura 30. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del fragmento interno de PA3327 de 1.1 kb del ORF PA3327 de 7.0 Kb.	63
Figura 31. Clonación del fragmento de 1.1 kb de PA3327 en el vector pGEM-T Easy.....	63
Figura 32. Verificación de inserción del fragmento en el vector p-GEM-t easy.	64
Figura 33. Obtención del cassette de resistencia a gentamicina con la enzima SmaI.	64
Figura 34. Ligación del cassette de resistencia a gentamicina y la construcción pGEM-T-PA3327 para obtener la construcción pGEM-t-PA3327::Gm.	65
Figura 35. Análisis de restricción de la construcción pGEM-t-PA3327::Gm.....	66
Figura 36. Subclonación de PA3327::Gm en pKOK4.	67
Figura 37. Cultivo de cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en Medio mínimo M9, fuente de carbono citronelol.....	67
Figura 38. Amplificación del cassette de resistencia a Gm en el ORF PA3327.....	67
Figura 39. Comprobación de inserción de cassette de resistencia a Gm en el ORF PA3327... ..	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Posibles NRPS en el genoma de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> obtenidos mediante alineamiento de AusA de <i>S. aureus</i>	29
Tabla 2. Actividades biológicas que presentan diversos ciclodipéptidos.	31
Tabla 3. Material biológico.....	39
Tabla 4. Plásmidos empleados.....	39
Tabla 5. Enzimas empleadas.....	39
Tabla 6. Antibióticos de selección.....	40
Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de fragmentos de dos genes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	40

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Determinación de elastasas generales producidas por las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	69
Gráfica 2. Determinación de la actividad de proteasas producidas por las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	70
Gráfica 3. Determinación de la piocianina producidas por las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1. .	71
Gráfica 4. Determinación de la pioquelina producida por las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1....	71
Gráfica 5. Determinación de pioverdiva producida por las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	72
Gráfica 6. Determinación de biopelículas producido por las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	72
Gráfica 8. Determinación de LPS producidos por las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	73
Gráfica 7. Determinación de ramnolípidos producidos por las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1..	73
Gráfica 9. Cromatograma obtenido del análisis por HPLC, extracción de CDPs de la mutante <i>ambB</i> ::Gm.....	74

Gráfica 10. Cromatograma obtenido del análisis por HPLC, extracción de CDPs de la mutante PA3327::Gm.	75
Gráfica 11. Cuantificación de los ciclo(L-Pro-L-Ile), ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) en los sobrenadantes de la cepa de referencia PAO1 y en las mutantes en <i>ambB</i> ::Gm y en PA3327::Gm.	76
Gráfica 12. Cuantificación del % de supervivencia de <i>C. elegans</i> por la toxicidad de los factores de virulencia secretados en el medio de 48 horas de crecimiento de las diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	77
Gráfica 13. Cuantificación del % de supervivencia de <i>C. elegans</i> por la infección de las distintas cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 de 48 horas de crecimiento..	78

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa considerada como un patógeno oportunista ya que afecta a personas con un sistema inmune comprometido causando graves infecciones en el sistema respiratorio y en tejidos suaves asociadas a ambientes intrahospitalarios. Esta bacteria posee un amplio arsenal de factores de virulencia (biopelículas, piocianina, sideróforos, enzimas proteolíticas, lipopolisacáridos, etc) que son importantes para el desarrollo de la infección en el huésped. La biosíntesis de los factores de virulencia bacterianos está regulada por un mecanismo de comunicación célula-célula denominado quorum sensing (QS), en el cual varias moléculas incluyendo ciclodipéptidos (CDPs), pueden modular o ser modulados por este sistema y así regular la expresión de los factores de virulencia. Por lo que el objetivo de este trabajo fue investigar la participación de genes que codifican para enzimas péptido sintetisas no ribosomales (NRPS) cuyos productos como CDPs y otros metabolitos pueden modular el QS de esta bacteria y así su patogenicidad. En este trabajo se estudiaron los ORFs PA3327 y PA2305, también denominado *ambB*, ya que de ambos se desconoce su participación en la síntesis de CDPs, así mismo también se determinó su papel en la virulencia de la bacteria *P. aeruginosa*. Se obtuvieron mutantes de esta bacteria en el ORF PA3327 y en el ORF PA2305 por interrupción génica mediante la inserción de un casete de resistencia a gentamicina, se determinó su producción de factor de virulencia, producción de CDPs y se evaluó su patogenicidad en un modelo *in vivo* de *Caenorhabditis elegans*.

La cuantificación de la biosíntesis de los factores de virulencia mostró que la producción de proteasas generales y pioquelina en ambas mutantes no mostraron diferencias significativas en comparación con la cepa de referencia PAO1 y solo se aumentó la producción de la elastasa en la mutante PA3327::Gm. La producción del sideróforo pioverdina disminuyó en ambas cepas mutantes y la producción del pigmento piocianina aumentó en la mutante *ambB*::Gm. Finalmente, ambas cepas mutantes en NRPS aumentaron la biosíntesis de biopelículas, ramnolípidos y lipopolisacáridos. Se lograron identificar en los sobrenadantes de ambas mutantes a los CDPs ciclo(L-Pro-L-Ile), ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe), de los cuales solo en la mutante *ambB*::Gm se observó un aumento significativo en el ciclo(L-Pro-L-Ile) en comparación con la cepa *P. aeruginosa* PAO1. Los ensayos en el modelo *C. elegans* con cultivos muestran que la mutación *ambB*::Gm en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 aumentó la patogenicidad, lo que corresponde con el incremento de los factores de virulencia asociados a la bacteria y la toxina piocianina; sin embargo, la mutante PA3327::Gm mostró una patogenicidad similar a la cepa silvestre PAO1. Los resultados obtenidos indican que las NRPS en *P. aeruginosa* PAO1 están implicados en la producción de factores de virulencia, los cuales influyen en la patogenicidad de la bacteria.

Palabras clave: *Pseudomonas*, virulencia, biopelículas, NRPS, patogénesis.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium considered an opportunistic pathogen, as it affects individuals with compromised immune systems, causing severe respiratory and soft tissue infections associated with hospital environments. This bacterium possesses a wide array of virulence factors (biofilms, pyocyanin, siderophores, proteolytic enzymes, lipopolysaccharides, etc.) that are crucial for the development of infections in the host. The biosynthesis of bacterial virulence factors is regulated by a cell-to-cell communication mechanism called quorum sensing (QS), in which various molecules, including cyclic dipeptides (CDPs), can modulate or be modulated by this system, thereby regulating the expression of virulence factors. Therefore, the objective of this study was to investigate the involvement of genes encoding non-ribosomal peptide synthetases (NRPS), whose products like CDPs and other metabolites can modulate the QS of this bacterium and thus its pathogenicity. In this study, the ORFs PA3327 and PA2305, also known as *ambB*, were investigated, as their role in CDP synthesis was unknown, and their role in the virulence of *P. aeruginosa* was also determined. Mutants of this bacterium were obtained for ORF PA3327 and ORF PA2305 by gene disruption through the insertion of a gentamicin resistance cassette, and their production of virulence factors, CDP production, and pathogenicity were evaluated in a *Caenorhabditis elegans in vivo* model.

Quantification of virulence factor biosynthesis showed that the production of general proteases and pyocyanin in both mutants did not show significant differences compared to the reference strain PAO1, and only elastase production increased in the PA3327::Gm mutant. Production of the siderophore pyoverdine decreased in both mutant strains, and production of the pigment pyocyanin increased in the *ambB*::Gm mutant. Finally, both NRPS mutants increased the biosynthesis of biofilms, rhamnolipids, and lipopolysaccharides. CDPs cyclic(L-Pro-L-Ile), cyclic(L-Pro-L-Tyr), cyclic(L-Pro-L-Val), and cyclic(L-Pro-L-Phe) were identified in the supernatants of both mutants, with only the *ambB*::Gm mutant showing a significant increase in cyclic(L-Pro-L-Ile) compared to the *P. aeruginosa* PAO1 strain. Assays in the *C. elegans* model with bacterial cultures showed that the *ambB*::Gm mutation in the *P. aeruginosa* PAO1 strain increased pathogenicity, corresponding to the increase in virulence factors associated with the bacterium and the toxin pyocyanin; however, the PA3327::Gm mutant showed similar pathogenicity to the wild-type PAO1 strain. The results obtained indicate that NRPS in *P. aeruginosa* PAO1 are involved in the production of virulence factors, which influence the bacterial pathogenicity.

Key words: *Pseudomonas*, virulence, biofilm, NRPS, pathogenesis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

En 1882 el farmacéutico francés Carle Gessard describió por vez primera a la bacteria *P. aeruginosa* en un estudio titulado "Sobre la coloración azul y verde de los vendajes". El nombre *Pseudomonas* se deriva de dos palabras provenientes del griego *Pseudo* que significa 'falso', *monas* que significa 'unidad única' y *aeruginosa* proveniente del latín *aerūgō* que significa 'cobre oxidado'. Microorganismo perteneciente al Reino Monera, filo Proteobacteria, subdivisión clase gamma, orden *Pseudomonadaceae*, género *Pseudomonas*, especie *aeruginosa* (Diggle & Whiteley, 2020).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa heterotrófica, móvil y en forma de bastón que mide cerca de 1-5 μm de largo y de 0.5-0.1 de ancho, la temperatura ideal para su crecimiento es de 37° C, pero puede sobrevivir hasta los 42° C, es capaz de crecer en medio de crecimiento mínimo con sales con una sola fuente de carbono. Esta bacteria se encuentra en suelo, ambientes marinos, reservorios de agua, tejidos vegetales y animales. El genoma de *P. aeruginosa* fue secuenciado completamente en el año 2000 revelando información sobre la relación entre la complejidad genética, la versatilidad metabólica y la diversidad ecológica de la bacteria, el tamaño de su genoma es de 6.3 millones de pares de bases, con 5570 marcos de lectura abiertos predichos, además contiene un gran número de genes reguladores así como genes involucrados en el catabolismo, transporte y eflujo de compuestos orgánicos así como sistemas de quimiotaxis, esto refleja una adaptación evolutiva que le confiere la capacidad de colonizar diversos nichos y resistir a diferentes sustancias antimicrobianas (Stover et al., 2000).

1.1.2. Importancia clínica de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es capaz de causar infecciones en plantas y humanos, es considerada como patógeno oportunista ya que infecta personas con un sistema inmune comprometido como aquellas con cáncer o SIDA. Esta bacteria es causante de graves infecciones respiratorias en pacientes con fibrosis quística, infecciones cutáneas en tejidos blandos como quemaduras y heridas diabéticas e infecciones de tracto urinario, también es la principal bacteria causante de enfermedades hospitalarias adquiridas por el uso de equipo médico como respiradores, catéteres, inhaladores, equipos de diálisis y equipos de anestesia (Azam & Khan, 2019). Esta bacteria ha evolucionado para encontrar nuevas formas de ser resistente a diferentes clases de compuestos químicos y buscar estrategias para intercambiar materiales genéticos, permitiendo que otras bacterias también se vuelvan resistentes a los medicamentos (Ghodhbane et al., 2015). La adquisición de resistencia a los fármacos en *P. aeruginosa* se debe a una serie de mecanismos que incluyen mutaciones en el cromosoma o la adquisición de ADN genético foráneo mediante transducción, conjugación o transformación que conduce a la recombinación en el cromosoma. Estos eventos junto con la resistencia intrínseca de la bacteria conduce a la expresión de diferentes mecanismos de resistencia tales como: impermeabilidad de la membrana externa y reducción de la captación, bombas de eflujo de

fármaco para la reducción de la concentración de fármaco intracelular e inactivación del fármaco a través de enzimas inactivadoras como β -lactamasas y amino-acetil-transferasas y proteinasas (El Zowalaty et al., 2015). *P. aeruginosa* se encuentra entre las 10 bacterias más peligrosas en hospitales alrededor el mundo ya que es capaz de causar infecciones en una amplia gama de tipos de tejidos (especialmente en huéspedes inmunodeprimidos) principalmente en los tejidos blandos, donde las infecciones resultantes pueden volverse agudas o crónicas (Crousilles et al., 2015).

1.2. Factores de virulencia

Un factor de virulencia se ha definido basándose en la capacidad que tiene un microbio para causar una enfermedad por la expresión de ciertas características microbianas particulares. Dichas características o también llamadas factores de virulencia se han definido como componentes que cuando son eliminados se reduce la virulencia, pero no la viabilidad del microorganismo. Los factores de virulencia pueden tener una amplia variedad de roles incluyendo: facilitar la unión o invasión en el huésped, evadir componentes del sistema inmune y evadir la detección del microorganismo por el sistema inmune del huésped (Casadevall & Pirofski, 2001).

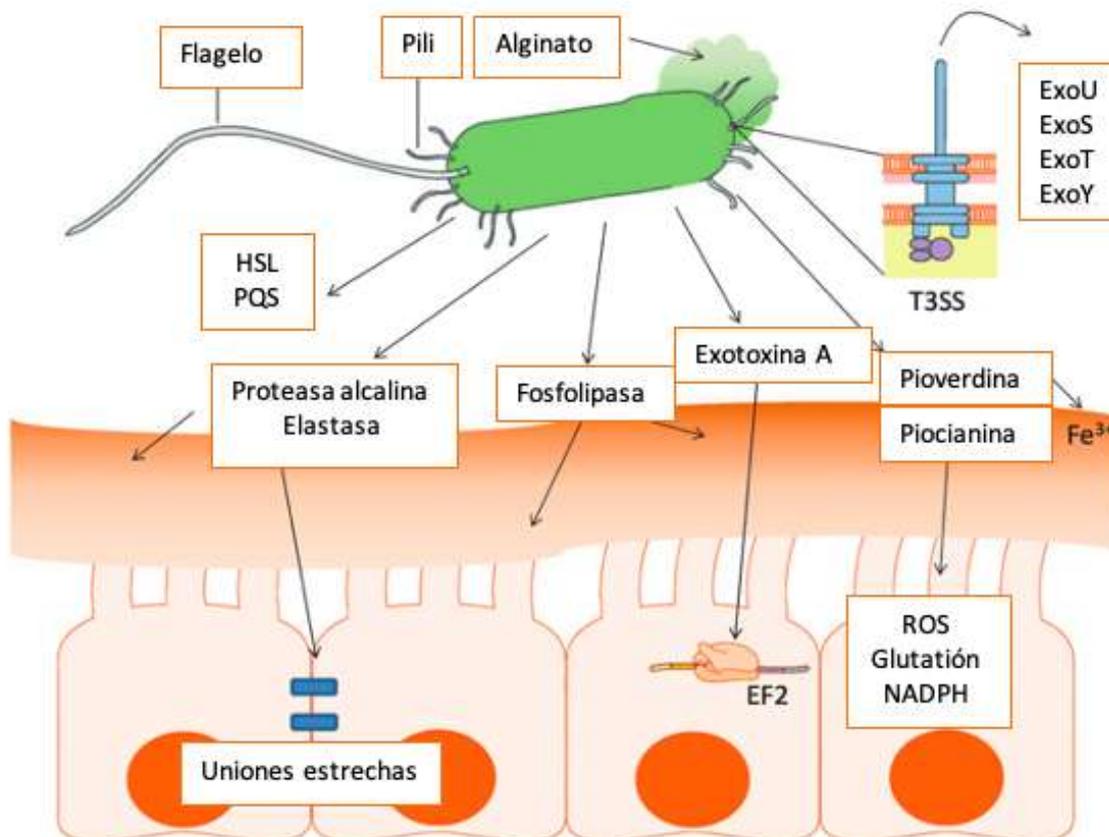


Figura 1. Diferentes factores de virulencia producidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Modificado de (Gellatly & Hancock, 2013).

Las infecciones causadas por *P. aeruginosa* son invasivas, toxigénicas y se caracterizan por la producción de compuestos extracelulares que contribuyen al desarrollo y establecimiento de las infecciones. *P. aeruginosa* secreta varios factores de virulencia que manipulan las células del hospedero, además de que componentes celulares de esta bacteria también actúan como factores de virulencia (El Zowalaty et al., 2015).

1.2.1. Biopelículas

La formación de biopelículas es un arma importante para *P. aeruginosa* para colonizar los tejidos pulmonares y una amplia variedad de superficies como materiales médicos. La mayoría de las bacterias tienen la habilidad de unirse a diferentes superficies y formar biopelículas. Una biopelícula es un agregado de bacterias aglomerado en una matriz extracelular con compuestos poliméricos (ADN extracelular, polisacáridos, proteínas y lípidos) es utilizado por las bacterias como estrategia de supervivencia en caso de que las condiciones como temperatura y disponibilidad de nutrientes sea variable e inestable, así mismo es una estrategia para evadir el sistema inmune y las terapias con antibióticos (Thi et al., 2020).

La matriz que conforma las biopelículas es responsable del 90% de la masa total de esta estructura y actúa como base para la adhesión de los componentes bióticos y abióticos, también provee nutrientes, enzimas y proteínas para las células de la biopelícula, además de que facilitan la comunicación célula-célula (Ryder et al., 2007). Los principales exopolisacáridos que conforman las biopelículas y le confieren soporte son: Psl, Pel y alginato. El Psl es un pentasacárido compuesto de residuos de D-glucosa, D-manosa y L-ramnosa, es necesario para la adhesión de las células a la superficie y la adhesión célula-célula en las primeras etapas de formación de las biopelículas. El Psl resulta beneficioso para las comunidades de la biopelícula pero no para las células libres, en una biopelícula madura el Psl se localiza a las afueras de la estructura confiriendo estabilidad estructural (Ma et al., 2009). El Psl también actúa como: una molécula señal que promueve la producción de c-di-GMP (monofosfato de guanosina dimérico bis-(3'-5')-cíclico) que resulta en una biopelícula más gruesa y robusta; protege a las células de agentes antimicrobianos, fagocitosis y facilita las infecciones persistentes (Thi et al., 2020).

El Pel es un polímero de polisacárido catiónico de N-acetil-D-glucosamina y N-acetil-D-galactosamina parcialmente desacetilados, está involucrado en la iniciación de la unión a la superficie y el mantenimiento de la integridad de la biopelícula, es responsable de la formación de la biopelícula formada en medios líquidos estáticos, también confiere tolerancia a antibióticos aminoglucósidos y repele al antibiótico colistina (Colvin et al., 2013).

El alginato es un polímero acetilado cargado negativamente que consta de residuos de ácido manurónico y ácido galacturónico, las proporciones en la composición influyen en la viscoelasticidad de la biopelícula. El alginato está involucrado en la maduración de la biopelícula, disminuye la difusión de antibióticos a través de la biopelícula y confiere protección de fagocitosis y opsonización (Gloag et al., 2018).

El desarrollo de las biopelículas se divide en cinco fases: en la primera fase las bacterias se adhieren dependientemente del material a las superficies mediante un pili o flagelo, en la

segunda fase se producen las sustancias poliméricas extracelulares (proteínas, lípidos, polisacáridos) y la adhesión celular se vuelve irreversible, en la tercer fase comienza la división celular y se comienzan a formar micro-colonias, en la cuarta fase la biopelícula madura y las micro-colonias forman estructuras con forma de hongo, la comunicación célula-célula induce la producción de factores de virulencia. En la quinta etapa se forma una cavidad al centro de la estructura tipo hongo que rompe la estructura de la biopelícula para la dispersión de las células libres y de vuelta a la primera fase, para la colonización de otro espacio (Thi et al., 2020).

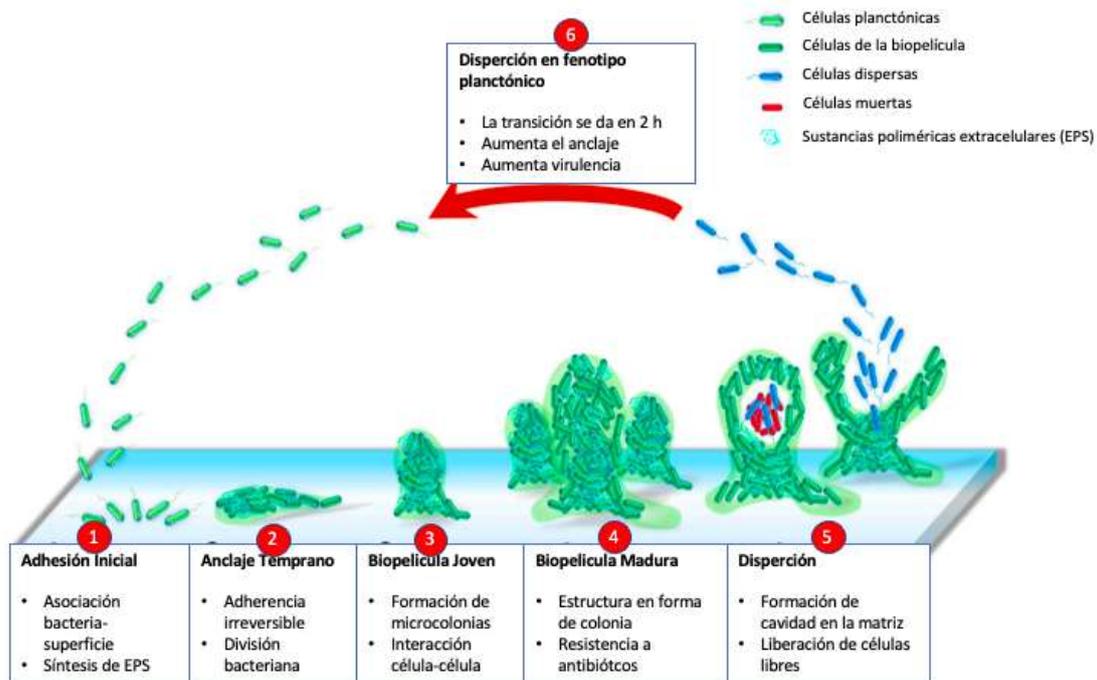


Figura 2. Etapas de la formación de biopelículas microbianas. Modificado de (Thi et al., 2020).

1.2.2. Flagelo y pili

Pseudomonas aeruginosa posee un único flagelo polar útil para la motilidad, adhesión y quimiotaxis (García et al., 2018). El flagelo participa en la adhesión a células epiteliales del huésped ya que este media la adhesión a la musina, una proteína glicosilada que es encontrada comúnmente en el esputo pulmonar de pacientes con fibrosis quística, consta de un filamento con un arreglo helicoidal conformado por subunidades de flagelina (Haiko & Westerlund-Wikström, 2013).

Los pili tipo IV son estructuras necesarias para el inicio de la infección ya que median la motilidad tipo twitching y la colonización de diferentes superficies, son apéndices filamentosos retráctiles localizados polarmente, están compuestos por moléculas de proteínas monoméricas, principalmente por pilina. El pili tipo IV tiene la característica de poder adherirse a diferentes superficies desde vidrio y acero inoxidable hasta células de mamíferos y promover la formación de micro-colonias y factores de virulencia (Burrows, 2012).

1.2.3. Lipopolisacáridos

La membrana externa de las bacterias gramnegativas se compone de una bicapa de fosfolípidos en la parte periplasmática y lipopolisacáridos (LPS) en la cara extracelular de esta membrana, por lo cual los LPS tienen un rol importante en la interacción de la bacteria con el ambiente en el que se encuentra, jugando un papel importante en la permeabilidad de su membrana, adhesión a superficies y formación de biopelículas (Huszczynski et al., 2019).

Los lipopolisacáridos se conforman de tres dominios:

El primer dominio es el lípido A es un disacárido de glucosamina acilada que se fosforila en las posiciones 1 y 4' que ancla los otros dos dominios de los lipopolisacáridos (LPS) a la membrana externa, las cadenas de acilo del lípido A se unen al receptor MD2 de las células del huésped activando las vías de señalización tipo toll (TLR 4) y los fosfatos que componen el lípido A interactúan con las quinolonas del sistema Pqs del *Quorum sensing* (QS) cuando estas son exportadas a la membrana externa induciendo la formación de vesículas membranales externas como mecanismo contra antibióticos (Florez et al., 2017).

El segundo dominio conocido como el dominio central consta de una región interna y otra externa que contienen heptosas y hexosas respectivamente, esta región provee estabilidad estructural a la membrana y disminuye la susceptibilidad a antibióticos hidrofóbicos y detergentes (Huszczynski et al., 2019)

El tercer dominio, Antígeno-O ó O-Polisacárido (OPS) es una cadena larga altamente variable compuesta por polisacáridos repetitivos lineales o ramificados, ya que el OPS se encuentra expuesto está involucrado en interacciones huésped-patógeno como la inhibición de la fagocitosis (Huszczynski et al., 2019).

1.2.4. Sistemas de secreción de proteínas

Los factores de virulencia secretados por la bacteria son importantes componentes que facilitan evadir la respuesta inmunitaria del huésped ocurrida durante la infección (Sharma et al., 2017). En *P. aeruginosa* se han identificado 6 sistemas (T1SS a T6SS) de secreción que exportan varias toxinas y enzimas hidrolíticas, estos sistemas se clasifican en dos tipos dependiendo de la ruta de las proteínas que transportan. El sistema de secreción de un paso secreta proteínas desde el citosol de la bacteria al exterior y comprende los sistemas T1SS, T3SS, T4SS y T6SS. El sistema de secreción de dos pasos requiere que la proteína permanezca en el periplasma para después ser liberadas al exterior y comprende a los T2SS y T5SS (Qin et al., 2022).

El T1SS secreta mayoritariamente proteínas como lipasas y proteasas, las proteínas contienen en su extremo C-terminal una señal para ser secretadas directamente al exterior de la bacteria, reconocido por un transportador ABC (una proteína transportadora, proteína de fusión de membrana y un factor de membrana externa). Este sistema secreta también la proteasa alcalina

AprA y al efector TesG que suprime a los neutrófilos durante las infecciones crónicas (Zhao et al., 2019).

El T2SS es responsable de secretar proteínas grandes y plegadas desde el periplasma, es el sistema de secreción más versátil de *P. aeruginosa*, participa en la secreción de guanilato-ciclase ExoA, proteasas LasA y LasB (Blevess et al., 2010).

El sistema T3SS tiene una estructura que asemeja una jeringa, se considera como el más importante ya que este exporta una amplia variedad de proteínas de virulencia llamadas efectores (ExoS, ExoT, ExoY y ExoU) desde el citoplasma bacteriano inyectándolos en la célula eucariota y causando muerte celular (Pena et al., 2019).

El T4SS puede transferir complejos proteicos y nucleoproteicos a través de las membranas, por lo que se relaciona con la resistencia a antibióticos y la transferencia horizontal de genes (Juhass et al., 2008).

Las proteínas del T5SS se denominan auto-transportadoras, una vez que las proteínas cruzaron la membrana interna, son transportadas a través de la membrana externa por un translocador barril β , secreta una variedad de proteínas entre las que se encuentran EstA, que tiene actividad esterasa y es involucrada en la producción de ramnolípidos y formación de biopelículas. (Meuskens et al., 2019).

Finalmente el T6SS transfiere sustratos que son efectores tóxicos para las células del huésped y emplea un mecanismo de perforación similar al de las colas contráctiles de los fagos, la secreción de la proteína Hcp1 se encuentra en el esputo de pacientes con fibrosis quística (Blevess et al., 2010).

1.2.5. Proteínas efectoras

En *P. aeruginosa* se han detectado 4 proteínas citotóxicas que son inyectadas mediante el T3SS (ExoU, ExoT, ExoS, and ExoY). ExoU es el efector con estructura más grande, posee 687 aminoácidos y se le atribuye la mayor actividad citotóxica y le confiere un fenotipo con mayor letalidad a las cepas, esta proteína posee una actividad de fosfolipasa que causa necrosis en las células del huésped, tiene una amplia gama de sustratos incluyendo fosfolípidos, lisofosfolípidos y lípidos neutros (Horna & Ruiz, 2021).

ExoT se compone de 457 aminoácidos es una exotoxina con dos funciones, la primera es GAP (proteína activadora de GTPasa) y ADPRT (adenosina difosfato-ribosil-transferasa) que en conjunto impiden la fagocitosis y rompen las barreras epiteliales ya que el dominio GAP inactiva tres pequeñas GTPasas (Rac, Rho y Cdc42) alterando la conformación del citoesqueleto de las células del huésped (Hauser, 2009). ExoS es conformado por 453 aminoácidos, también presenta dos actividades tóxicas GAP y ADPRT, causando muerte celular, la alteración de la actina del citoesqueleto e inhibiendo la síntesis de ADN (Hauser, 2009). El efector ExoY se compone de 378 aminoácidos y es una nucleotidil-ciclase que eleva los niveles intracelulares de varios nucleótidos cíclicos al ser inyectado en las células del huésped, activando diferentes proteínas cinasas, causando el aumento de la permeabilidad epitelial causando la pérdida de la función de los órganos del sistema respiratorio (Wagener et al., 2020).

1.2.6. Enzimas proteolíticas

Pseudomonas aeruginosa es capaz de liberar diferentes tipos de enzimas proteolíticas extracelularmente, mediante sistemas de secreción como el T2SS, las principales son las elastasas Las A, Las B y la proteasa alcalina AprA que degradan tejidos y componentes del sistema inmune del huésped, promoviendo la colonización (X.-H. Li & Lee, 2019). Se ha demostrado que la mayoría de las cepas de aislados clínicos y ambientales tienen actividad proteolítica, además aproximadamente el 3% del genoma de *P. aeruginosa* contiene marcos de lectura abiertos que codifican para proteasas (Stover et al., 2000).

La elastasa LasB o pseudolisina es una metaloproteasa dependiente de zinc, codificada por el gen *lasB* que contiene un péptido señal para la exportación de esta a través de la membrana interna al periplasma y su posterior excreción por el T2SS después de su plegamiento. El principal sustrato de esta enzima es la elastina pero también es capaz de escindir otras proteínas de la matriz extracelular como el colágeno tipo III y IV, además de atacar las uniones estrechas y provocar la interrupción epitelial (Gellatly & Hancock, 2013).

La elastasa LasA, una metaloproteasa también denominada estafilolisina ya que es capaz de escindir los enlaces de pentaglicina en el peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*, al igual que LasB esta proteasa se expresa en su forma inmadura con tres dominios y es procesada dos veces durante su secreción para liberar su forma madura al medio. LasA posee una menor actividad sobre la elastina, pero aumenta la actividad de otras elastasas (Galdino et al., 2017).

La proteasa alcalina, conocida como aeruginolisina es una metaloproteasa dependiente de zinc y es secretada por el T1SS, los principales sustratos de esta proteasa incluyen la laminina y fibronectina que son componentes importantes del endotelio del huésped por lo que desempeña una función importante en la invasión de tejidos (Gellatly & Hancock, 2013), además se ha demostrado que AprA es importante para la evasión del sistema inmune ya que degrada componentes proteicos que conforman el complemento (Laarman et al., 2012).

1.2.7. Ramnolípidos

Se ha demostrado que *P. aeruginosa* produce biosurfactantes denominados ramnolípidos, los cuales son moléculas anfipáticas compuestas por una porción hidrófoba que consiste en un ácido graso y una porción hidrófila compuesta de mono- o di-(L)-ramnosa, unidos a través de un enlace O-glucosídico (Soberón-Chávez et al., 2005).

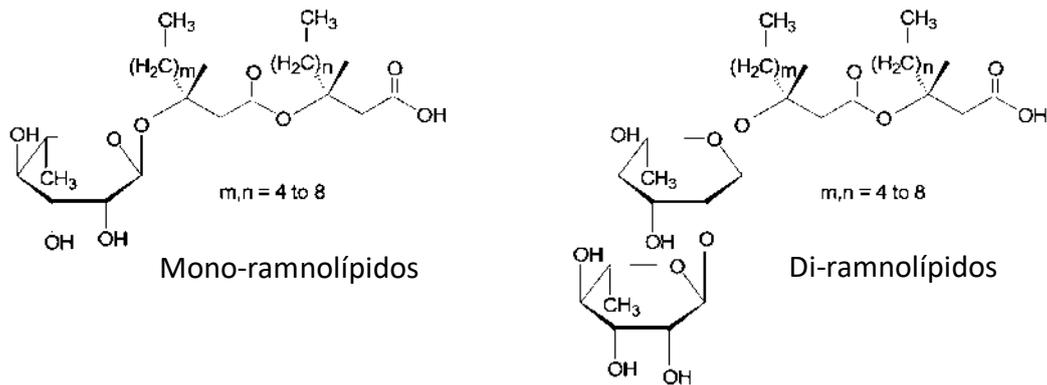


Figura 3. Estructura química de los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Modificado de (Soberón-Chávez et al., 2005).

La regulación transcripcional de la biosíntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa* se encuentra bajo el control del sistema de quorum-sensing, al activarse el sistema RhIR que a su vez activa el operón de genes *rhlABC*, la proteína RhIA participa en la síntesis de los precursores de ramnolípidos, un grupo de moléculas denominadas HAA (ácidos 3-(3-hidroxi)alcanoiloxi) alcanóicos) que conforman el residuo lipídico conformado de un dímero de ácidos grasos, después la ramnosil-transferasa RhIB emplea dTDP-L-ramnosa y un HAA como precursores, para producir mono-ramnolípidos, estas moléculas a su vez serán los sustratos junto con dTDP-L-ramnosa, de la proteína RhIC para producir di-ramnolípidos (Soberón-Chávez et al., 2021). La síntesis de la fracción de ácidos grasos en los ramnolípidos, procede de la ruta biosintética general de los ácidos grasos de *P. aeruginosa*, la enzima RhIG captura a los precursores de esta ruta para sintetizar ramnolípidos y posteriormente ser modificados por RhIA (Campos-García et al., 1998).

Se ha demostrado que los ramnolípidos tienen varios papeles en la virulencia de *P. aeruginosa*; ya que la estructura química de estas moléculas las convierte en surfactantes naturales por lo que tienen la actividad de solubilizar los fosfolípidos de los surfactantes pulmonares, haciéndolos más accesibles para las enzimas proteolíticas secretadas por la bacteria (Qin et al., 2022). Además se ha demostrado que la motilidad en enjambre requiere de la presencia de ramnolípidos y sus precursores HAA ya que estos disminuyen la tensión superficial (S. Wang et al., 2014). Los ramnolípidos también juegan un papel importante en la formación de biopelículas y la estabilidad de esta estructura lo cual depende de la producción en cantidad y en las etapas adecuadas, ya que elevadas cantidades de ramnolípidos pueden alterar la adhesión célula-célula y a las superficies en las etapas primarias de formación de biopelículas, así mismo en etapas tardías una alta cantidad de ramnolípidos promueve la dispersión de las bacterias para continuar colonizando superficies (Nickzad & Déziel, 2014). A estas moléculas se les asocia también con la invasión de tejidos del huésped, ya que son necesarios para la infiltración al epitelio de las vías respiratoria y consecuente invasión bacteriana, así los ramnolípidos disminuyen la resistencia trans-epitelial, insertándose en las membranas celulares y alterando las propiedades de las uniones estrechas (Zulianello et al., 2006).

1.2.8. Sideróforos

Las bacterias requieren del hierro para su supervivencia, crecimiento y virulencia ya que este elemento está involucrado en diversos procesos metabólicos esenciales como cofactores de enzimas y proteínas redox. El hierro suele estar insuficientemente biodisponible ya que es un factor de competencia entre especies bacterianas, es poco soluble en condiciones acuosas y se encuentra unido a proteínas transportadoras de hierro del huésped como la transferrina y lactoferrina (Begg, 2019). Los microorganismos han desarrollado estrategias para absorber el hierro de su ambiente o huésped, una de estas estrategias es la producción de sideróforos. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular (500-1500 Da) que poseen una alta afinidad por el hierro (Fe^{3+}), una de las principales estrategias que posee *P. aeruginosa* para la captación de hierro férrico (Fe^{3+}) es la producción de los sideróforos pioverdina y pioquelina (Hider & Kong, 2010). Otras estrategias empleadas por *P. aeruginosa* es la captación de xeno-sideróforos, que son sideróforos producidos por otras bacterias o microorganismos, la captación del grupo hemo de las hemoproteínas del huésped y mediante sistemas de reducción extracelular de Fe^{3+} a Fe^{2+} mediante el sistema FeO. *P. aeruginosa* tiene la habilidad de la estrategia de absorción de hierro para cubrir con sus necesidades del metal sin gastar demasiada energía y dependiendo del tipo de infección que se establezca (Cornelis & Dingemans, 2013). Al establecer una infección aguda, el sistema de captación de hierro preferible por la bacteria es el sideróforo pioverdina que actúa al mismo tiempo como molécula señal para producir factores de virulencia y en una infección crónica depende de estrategias como la captación del grupo hemo de las hemoproteínas (Hunter et al., 2013).

1.2.8.1. Pioverdina

Este sideróforo producido por las especies de *Pseudomonas* fluorescentes es un compuesto mixto de una cadena peptídica de 6 a 12 aminoácidos, con una secuencia específica, y ligado a un cromóforo que cumple con la función catecolato uniéndose al Fe^{3+} , las cepas de *P. aeruginosa* producen tres diferentes tipos de pioverdinas dependiendo de las diferencias en la cadena peptídica (PVDI, PVDII y PVDIII), *P. aeruginosa* PAO1 produce la PVDI (Cornelis & Dingemans, 2013).

La PVDI es sintetizada por enzimas péptido sintetasas no ribosomales (PvdL, PvdI, PvdJ y PvdD) en el citoplasma (Visca et al., 2007), este péptido madura en el periplasma y finalmente es secretado al medio extracelular por la bomba de eflujo dependiente de ATP PvdRT-OpmQ, en el espacio extracelular al quelar el hierro se forma el complejo PVDI- Fe^{3+} y este es reconocido por la membrana externa bacteriana y transportado al periplasma mediante los transportadores FpvAI y FpvB, posteriormente la liberación del hierro ocurre al ser reducido por la reductasa FpvG2 en la membrana interna (Bonneau et al., 2020).

La pioverdina tiene una alta afinidad por el hierro secuestrando fácilmente este metal de la transferrina del huésped, además de actuar como sideróforo funciona como molécula señal ya que desencadena la producción de factores de virulencia como proteasas y la exotoxina A, la pioverdina es también necesaria para el establecimiento de infecciones agudas y el establecimiento de biopelículas en estado maduro (Cornelis & Dingemans, 2013).

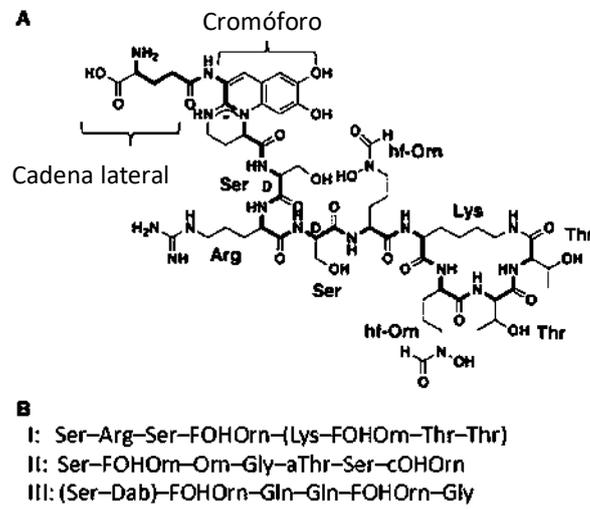


Figura 4. (A) Estructura de PVDI producida por *P. aeruginosa* PAO1 (B) Secuencia de las cadenas peptídicas de PVDI, II y III. Modificado de (Cornelis & Dingemans, 2013).

1.2.8.2. Pioquelina

Este sideróforo posee una menor afinidad al hierro que la pioverdina, *P. aeruginosa* produce principalmente pioquelina y cuando la concentración de hierro es muy baja comienza la producción de pioverdina. Se trata de un sideróforo que contiene tiazolina su estructura contiene tres centros quirales, que crean un sitio de unión fuerte para el Fe^{3+} (Hider & Kong, 2010).

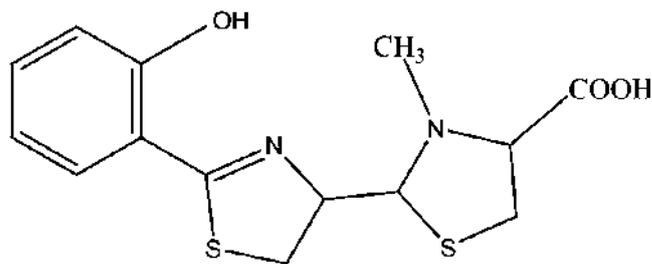


Figura 5. Estructura de la pioquelina producida por *Pseudomonas aeruginosa*. Tomado de (Ghssein & Ezzeddine, 2022).

La biosíntesis de esta molécula es llevada a cabo por enzimas péptido sintetetas no ribosomales codificadas por dos operones *pchDCBA* y *pchEFGHI* que en conjunto con las moléculas precursoras ensamblarán la pioquelina (PCH) (una molécula de salicilato, dos moléculas de cisteína y un hidroxiaácido) (Ronnebaum & Lamb, 2018).

Una vez que el hierro es quelado en el medio extracelular, el complejo PCH-Fe^{3+} es transportado al periplasma por el transportador de membrana externa FptA y posteriormente este complejo se

disociará en el periplasma y los iones libres serán transportados al citoplasma bacteriano por la proteína PchH1 (Braud et al., 2009).

Además de la actividad de sideróforo que presenta la pioquelina, se ha observado que puede causar daño oxidativo e inflamación en los tejidos al presentarse en conjunto con la piocianina (Cornelis & Dingemans, 2013).

1.2.9. Piocianina

La piocianina (PCN) es un compuesto aromático que contiene nitrógeno, perteneciente a la familia de las fenacinas tricíclicas. Es eléctricamente neutro (zwitterion), contiene un grupo fenol que le confiere características ácidas débiles, a pH fisiológico la PCN existe en su estado neutro con una coloración azul y su forma protonada en ambientes ácidos se caracteriza por un color rojo (Hall et al., 2016).

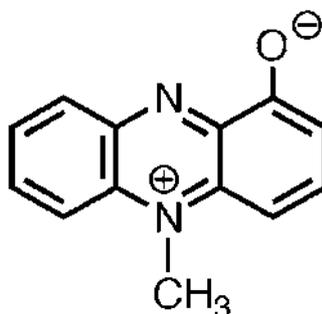


Figura 6. Estructura química de la piocianina producida por *Pseudomonas aeruginosa*. Tomado de (Jayaseelan et al., 2014).

Alrededor del 95% de las cepas aisladas de *P. aeruginosa* producen este pigmento azul, responsable de causar una coloración verde-azul en el pus producido en las infecciones de *P. aeruginosa*, además esta fenazina es producida en medios con bajos niveles de hierro ya que participa en la reducción y liberación del hierro de la proteína transferrina del huésped (Jayaseelan et al., 2014).

La PCN es sintetizada a partir del precursor corismato (producto final de la vía del shikimato), este precursor será sometido a modificaciones hasta llegar al ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), dichas modificaciones serán realizadas por dos operones con siete genes cada uno, *phzA1B1C1D1E1F1G1* y *phzA2B2C2D2E2F2G2*, después el PCA será modificado en dos pasos por los genes *phzM* que codifica para una metiltransferasa específica de fenazina y *phzS* que codifica para una monooxigenasa dependiente de flavina (Gonçalves & Vasconcelos, 2021)

El estrés oxidativo es el principal efecto tóxico causado por la PCN al penetrar fácilmente a través de membranas biológicas, debido a que esta molécula provoca un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) como radicales superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en las células, este proceso es mediado por una enzima dismutasa en condiciones anaeróbicas. Bajo condiciones aeróbicas las ROS se forman mediante una reducción no enzimática mediada por NAD(P)H al donarle electrones a la PCN. Las concentraciones intracelulares de ROS causan daño oxidativo a los componentes del ciclo celular, directamente

al ADN e inhibición enzimática, teniendo como principal blanco a las mitocondrias y como consecuencia causando lisis celular (Hall et al., 2016).

Se han realizado varios estudios sobre los efectos de la PCN en modelos *in vivo*, resaltando que esta molécula también posee propiedades pro-inflamatorias e inmuno-moduladoras sobre el huésped. La PCN altera la expresión y liberación de citocinas *in vivo*, inhibiendo la proliferación de linfocitos B y como consecuencia se disminuye la respuesta inmune (Lau et al., 2004).

1.3. Quorum sensing

Las bacterias poseen la habilidad de actuar colectivamente en un grupo multicelular, ejerciendo comportamientos sociales de cooperación para el beneficio de la población bacteriana, los comportamientos coordinados suelen ser inútiles al ser llevados a cabo por una sola bacteria, pero al coordinarse las células en conjunto se genera un beneficio, incluyendo bioluminiscencia, producción de metabolitos secundarios y factores de virulencia captación de ADN y formación de biopelículas. El mecanismo empleado que utilizan las bacterias para interactuar y modular su comportamiento comunitario es denominado quorum sensing (QS) (Mukherjee & Bassler, 2019).

El QS es definido como un tipo de comunicación célula-célula dependiente de la densidad poblacional, la manera en la que se produce esta comunicación celular es mediante moléculas denominadas autoinductores (AI) que son producidas por una autoinductor-sintasa, al haber una baja densidad celular bacteriana estas moléculas se encuentran en una baja concentración en el medio, la concentración de AI va aumentando a medida que aumenta la densidad celular hasta que se alcanza un umbral de concentración y las moléculas de AI pueden ser percibidas por una proteína receptora, causando cambios en la expresión de genes blanco de la población bacteriana. A menudo, los complejos autoinductor-receptor activan la expresión del gen que codifica la autoinductor-sintasa. (Waters & Bassler, 2005). Los complejos de autoinductor-receptor suelen activar la expresión del gen que codifica para la sintasa del autoinductor que aumenta la concentración extracelular del AI a medida que las bacterias entran en el modo de detección de quórum. Se plantea que este bucle de autoinducción sincroniza los comportamientos en toda la población bacteriana (Mukherjee & Bassler, 2019).

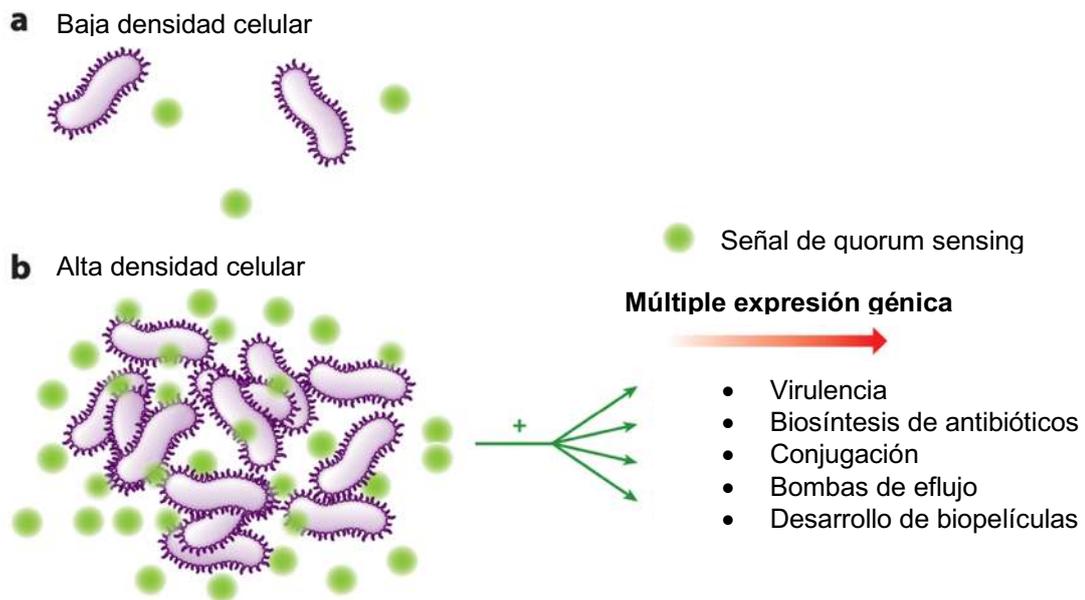


Figura 7. Sistema general de quorum sensing bacteriano. (a) Los AI son producidos en baja concentración (b) Con una alta densidad celular los AI alcanzan un umbral de concentración que desencadena la expresión de múltiples genes. Modificado de (Azimi et al., 2020).

En 1980 comenzó a elucidarse este mecanismo, al descubrir los genes encargados de producir la luminiscencia (*luxICDABE*, operón de la luciferasa) en la bacteria marina *Vibrio fischeri*, así mismo también se descubrieron los genes encargados de controlar este fenómeno, *luxR* y *luxI* que en conjunto regulan la transcripción de los genes *lux*. El gen *luxI* codifica para la autoinductor-sintasa que es requerida para la producción del AI N-3-oxohexanoil-L-homoserina lactona (3OC6-HSL), mientras que *luxR* codifica para una proteína reguladora de la transcripción sensible a 3OC6-HSL (Engebrecht & Silverman, 1984). Este descubrimiento conllevó a la búsqueda de sistemas homólogos en otras especies bacterianas, encontrando que este sistema de comunicación estaba presente en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas y que existían sistemas de tipo *luxI-luxR* que controlaban la expresión de genes para conjugación, síntesis de antibióticos, producción de metabolitos y exoenzimas en diversas especies de bacterias, con semejanzas como moléculas de acil-homoserina lactonas (AHL) empleadas como AI en algunos casos (Campbell et al., 2009).

Las bacterias Gram-negativas emplean moléculas pequeñas como las AHL a modo de AI y dos tipos de proteínas receptoras para su detección, factores de transcripción citoplasmáticos o cinasas censoras de histidina de dos componentes transmembranales, además diversas cadenas laterales (R) de acilo graso de longitud variable y sustituciones de cadena lateral se incorporan a las señales AHL, estas diferencias son importantes para la señalización y la especificidad de los diferentes sistemas de QS ya que las proteínas de tipo LuxR poseen un bolsillo de unión acilo que se ajusta con precisión a un resto de cadena lateral R particularmente (Waters & Bassler, 2005).

Las bacterias Gram-positivas emplean oligopéptidos modificados denominados como péptidos auto-inducidos (AIPs) como moléculas señal y las proteínas receptoras asociadas son quinasas censoras de histidina de dos componentes transmembranales, la mayoría de las señales de péptidos se escinden de péptidos precursores más grandes, que luego serán modificados para contener anillos de lactona y tiolactona, lantioninas y grupos isoprenilo. Los AIP controlan una variedad de funciones bacterianas en bacterias Gram-positivas, como la esporulación en *Bacillus subtilis* y la virulencia en *Staphylococcus aureus* (Novick & Geisinger, 2008).

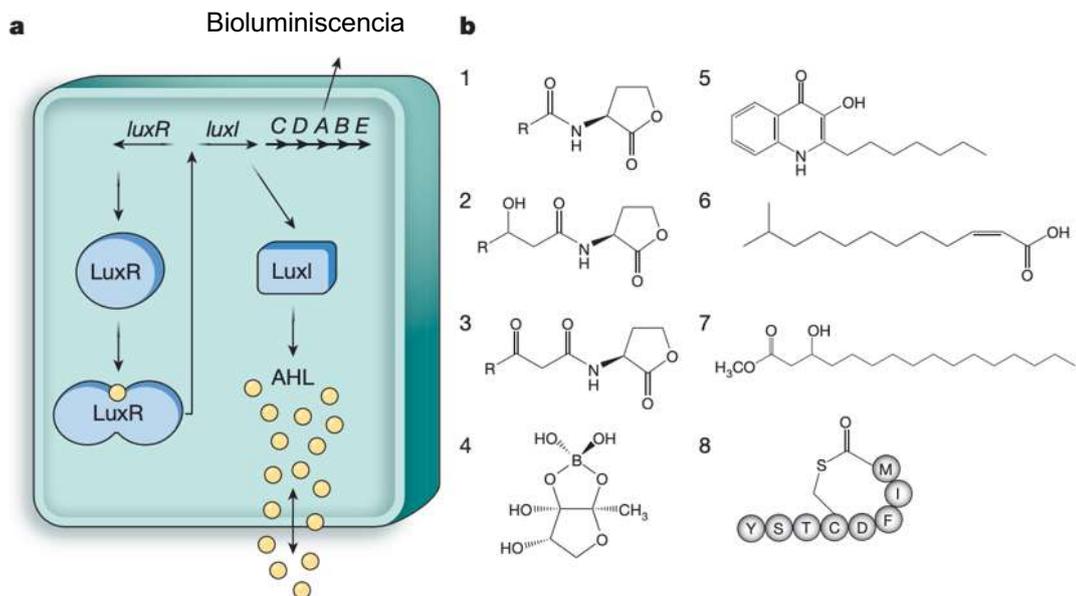


Figura 8. Sistema canónico de QS y diversidad de moléculas AI. (a) Sistema de QS para la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*. (b) Ejemplos de moléculas señal de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. (1) N-acil-homoserina lactona. (2) N-(3-hidroxiacilo) homoserina lactona. (3) N-(3-oxoacil)-l-homoserina lactona. (4) El autoinductor-2 de *V. harveyi*. (5) 2-heptil-3-hidroxi-4(1H)-quinolona. (6) Factor de señalización difusible (DSF), ácido metil-dodecenóico. (7) Éster metílico del ácido hidroxi-palmitico (PAME). (8) Péptido autoinductor 1 (AIP-1). Modificado de (Whiteley et al., 2017).

1.3.1. Quorum sensing de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa tiene la capacidad de adaptarse a diferentes ambientes y cambiar su comportamiento poblacional dependiendo del tipo de infección que se establezca; las infecciones agudas son causadas por fenotipos planctónicos altamente virulentos para la colonización y evasión de sistema inmune pero pueden ser fácilmente eliminados por tratamiento con antibióticos (Langan et al., 2015), por lo que la colonización del nicho del huésped ocurre al existir un cambio a un fenotipo crónico, menos virulento que gracias a la formación de biopelículas no puede ser eliminado mediante antibióticos, este cambio de fenotipo requiere que también exista una modulación en la secreción y producción de factores de virulencia (piocianina, sideróforos, proteínas efectoras y proteolíticas, ramnolípidos, biopelículas, etc.) (Martin et al., 2018). Durante las últimas dos décadas se ha elucidado que la regulación de estos factores de virulencia así como la transición de los estadios de infección de esta bacteria son regulados por

un sofisticado sistema de QS compuesto por reguladores genéticos que responden a moléculas de señal afines a los cambios en las condiciones ambientales (Meng et al., 2020).

1.3.1.1. Sistemas *las* y *rhl*

Los sistemas mejor caracterizados en *P. aeruginosa* comprenden dos homólogos de LuxIR, dependientes de AHL, el sistema *las* se compone de LasI, que sintetiza el AI N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (3OC12HSL) y su regulador transcripcional LasR, análogamente el sistema *rhl* se compone del autoinductor-sintasa RhlI que produce el AI N-butiril-L homoserina lactona (C4HSL) y su respectivo regulador transcripcional RhlR (Alfiniyah et al., 2019).

Se plantea que el QS de *P. aeruginosa* es jerárquico, teniendo el nivel más alto en la jerarquía al sistema *las*, al aumentar la densidad celular y la concentración del AI 3-OC12HSL, se forma el complejo 3-OC12HSL-LasR, el cual activa la transcripción de RhlI, sintetizando C4HSL que se acopla a su regulador transcripcional RhlR. Los complejos 3OC12HSL-LasR y RhlI-C4HSL se unen a las cajas *las-rhl* conservadas que se encuentran en los promotores de genes diana, activando así su expresión transcripcional, por lo tanto, el sistema *las* y *rhl* ejerce un control transcripcional sobre la producción de factores de virulencia extracelulares, como elastasa, proteasa alcalina, proteasa LasA, exotoxina A, ramnolípidos, piocianina, cianuro de hidrógeno, citotóxicos (Lee & Zhang, 2015).

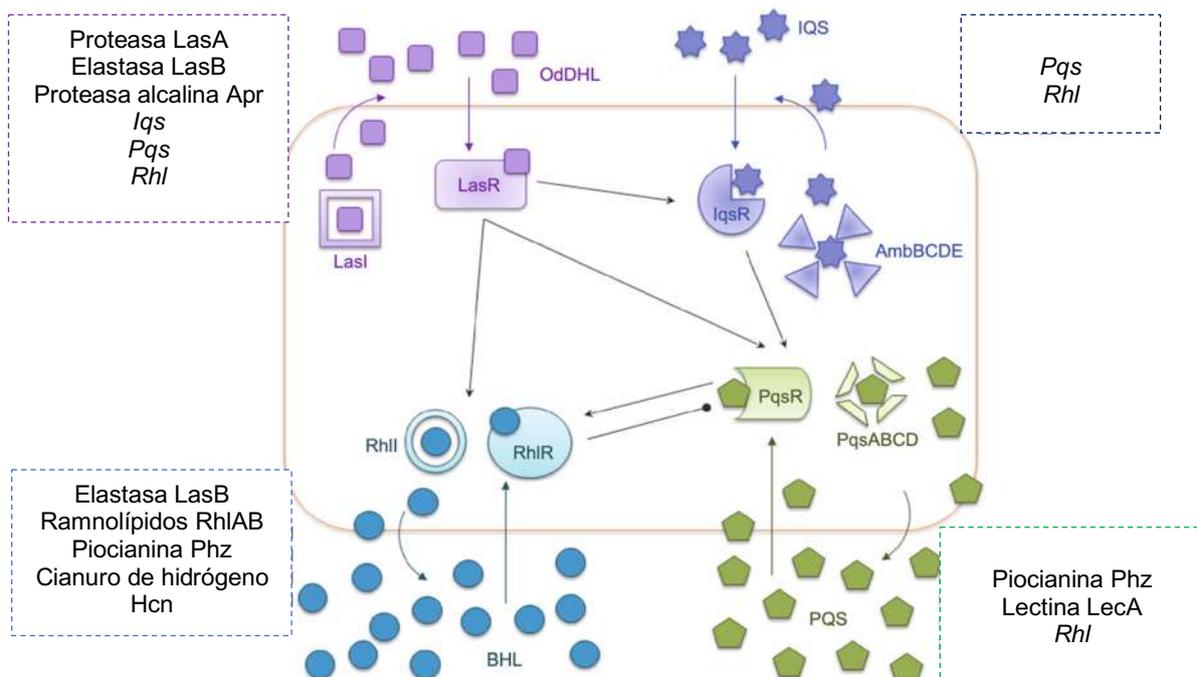


Figura 9. Red jerárquica de los cuatro sistemas de QS de *Pseudomonas aeruginosa*. Modificado de (Lee & Zhang, 2015).

1.3.1.2. Sistema *pqs*

El tercer sistema de QS comprende a la molécula denominada señal de quinolona de *Pseudomonas* o 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS), sintetizada por el conjunto de genes *pqsABCDE* y *phnAB* que codifican para el precursor 2-heptil-4-quinolona (HHQ) que después es convertido en PQS por PqsH y se une a su regulador transcripcional MvfR (factor de virulencia múltiple también conocido como PqsR). PqsE, es una proteína involucrada en la producción de pirocianina, que activa al sistema *rhl* y a su vez, la regulación del sistema PQS es modulada por los sistemas *las* y *rhl*, que actúan positiva y negativamente, respectivamente sobre el sistema *pqs* (García et al., 2018).

1.3.1.3. Sistema *iqs*

La cuarta señal de comunicación es capaz de integrar señales de estrés ambiental a la red de QS, se denominó IQS y se estableció su estructura como 2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído, el regulador transcripcional de este AI aún es desconocido y se ha planteado que su biosíntesis es llevada a cabo por el clúster de genes *ambBCDE* el cual engloba a dos enzimas péptido sintetetas no ribosomales (NRPS), AmbB y AmbE. La producción de IQS es activada en respuesta al regulador de respuesta al estrés por fosfato PhoB, estrés que suele ser común durante los procesos infecciosos (Lee et al., 2013).

1.4. Péptido sintetetas no ribosomales (NRPS)

Existe una gran variedad de productos naturales derivados de microorganismos que suelen tener diversas actividades y propiedades biológicas, estos compuestos otorgan beneficios selectivos a los microorganismos promoviendo resistencia al ambiente o patogénesis y colonización de ambientes, además una gran variedad de fármacos, principalmente antibióticos están inspirados en estas moléculas de origen natural, por lo que ha sido de interés investigar la biosíntesis de estos, encontrando que la gran mayoría son producidos enzimáticamente vía enzimas denominadas péptido sintetetas no ribosomales (NRPS) (Newman & Cragg, 2016).

Las NRPS forman parte de una amplia familia de enzimas biosintéticas que a partir de precursores aminoacídicos pueden ensamblar péptidos variados con varias actividades biológicas (antifúngicas, antibióticas, anti-tumorales) (Jaremko et al., 2020). Las NRPS se definen como biocatalizadores multimodulares que median la síntesis de péptidos macrocíclicos bioactivos complejos independientemente de una plantilla derivada de ácido nucleico, de las cuales cada módulo ensambla un aminoácido específico al péptido y a su vez cada módulo se compone de varios dominios catalíticos que catalizan los pasos para el ensamblaje (Hwang et al., 2020).

Cada módulo de un NRPS se compone de tres dominios ubicuos que catalizan la elongación de los precursores peptídicos; un dominio A para el reconocimiento y activación del aminoácido como acil-adenilato, un dominio PCP o T de la proteína transportadora de peptidilo (PCP), el cual

es el sitio de unión del cofactor PPant (4'-fosfopanteteína) al que se unen los sustratos y un dominio C que cataliza la formación de enlaces peptídicos entre dos sustratos unidos al dominio PCP y suele haber un cuarto dominio TE con actividad de tioesterasa para la liberación del producto (Bonhomme et al., 2021).

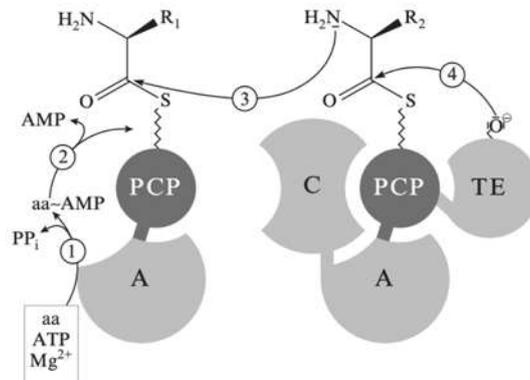


Figura 10. Diagrama general de un módulo de NRPS y sus dominios generales. Tomado de (Marahiel & Essen, 2009).

En las líneas de ensamblaje en las NRPS lineales el orden y número de módulos catalíticos coincide de la misma manera con el orden de los aminoácidos que se agregan, un ejemplo es la línea de ensamblaje del dodecapéptido cíclico ramificado bacitracina, sintetizado por *Bacillus subtilis*, en la que el clúster de genes (*bacABC*) codifican para las bacitracina sintetetas (BacA, BacB y BacC) las cuales se componen 12 módulos y 40 dominios catalíticos (Marahiel, 2009).

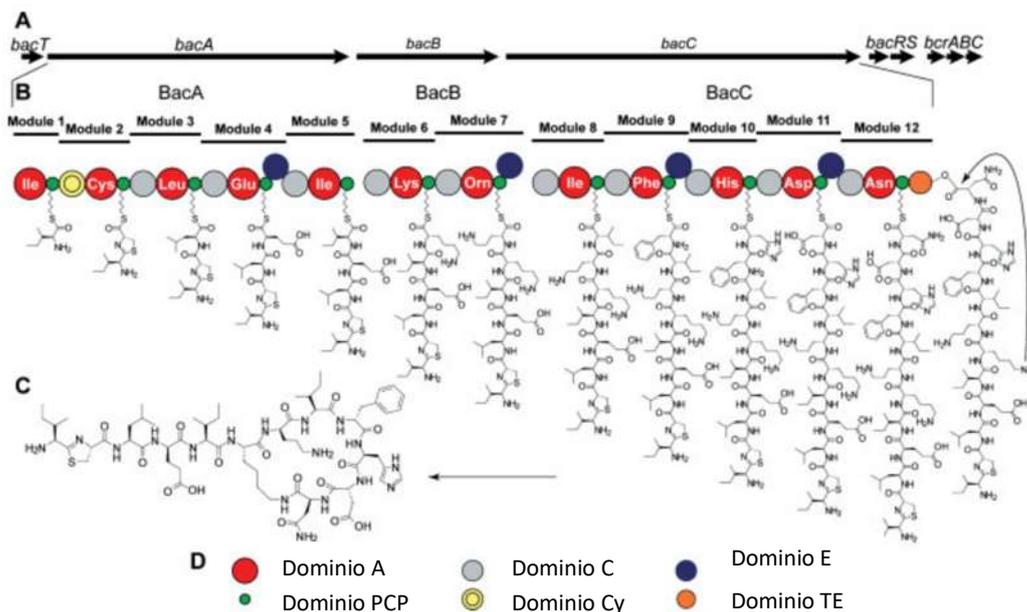


Figura 11. Línea de ensamblaje de la NRPS para el dodecapéptido cíclico ramificado, bacitracina, sintetizado por *Bacillus subtilis*. Modificado de (Marahiel, 2009).

La gran diversidad de péptidos no ribosomales surge a partir de la acción de dominios adicionales para la modificación de sustratos, como los dominios de ciclación (Cy), epimerización (E),

formilación (F), cetereductasa (KR), metiltransferasa (Met) y oxidasa (Ox), que modifican el péptido en construcción (McErlean et al., 2019).

1.4.1. Dominio A

Los dominios de adenilación de las NRPS pertenecen a una familia de enzimas formadoras de adenilato, se componen alrededor de 500 aminoácidos y son clave para el ensamblaje de un péptido no ribosomal, estos son esenciales para la selección y activación de unidades monoméricas (Izoré & Cryle, 2018).

Los dominios A y las aminoacil-tRNA-sintetasas catalizan reacciones similares; la activación de aminoácidos dependiente de ATP y posterior transferencia a una molécula portadora adecuada, se componen de un gran subdominio N-terminal (~400 aminoácidos) y un pequeño subdominio C-terminal flexible (~100 aminoácidos), con un sitio activo hidrofóbico en el medio (Marahiel, 2009).

El dominio A selecciona un aminoácido y lo activa vía adenilación ($\text{ATP} + \text{amino ácido} \rightarrow \text{aminoacil adenilado} + \text{PPi}$) convirtiéndolo en un sustrato competente para transferirlo al grupo tiol del grupo protésico Ppant del PCP (Izoré & Cryle, 2018).

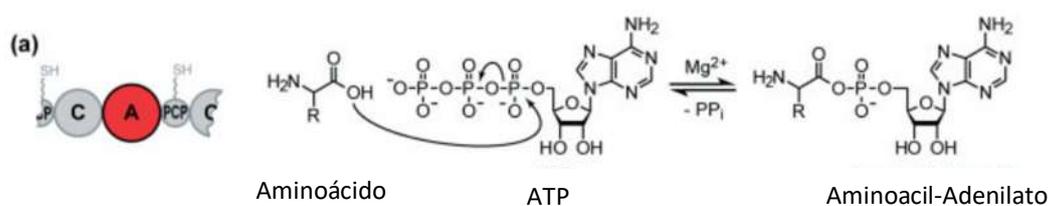


Figura 12. Reacción catalizada por el dominio A. Modificado de (Marahiel, 2009).

1.4.2. Dominio PCP

El dominio PCP se compone de ~80 aminoácidos, este funciona como una plataforma de anclaje para el transporte de aminoácidos a los dominios catalíticos del módulo. Se conforma como un haz de cuatro hélices (I, II, III y IV) conectadas por bucles. (Bonhomme et al., 2021). Las PCP requieren de una activación postraduccional: una forma apo inactiva de PCP será el sustrato de una fosfopanteteinil-transferasa (PPTasa) que cataliza la transferencia de un brazo de fosfopanteteína (PPant) con un grupo tiol a un residuo de serina en la hélice II (forma holo), este brazo es derivado de la coenzima A (CoASH), los péptidos y aminoácidos se cargan temporalmente en el PCP a través de este brazo por medio de un enlace tioéster (Izoré & Cryle, 2018).

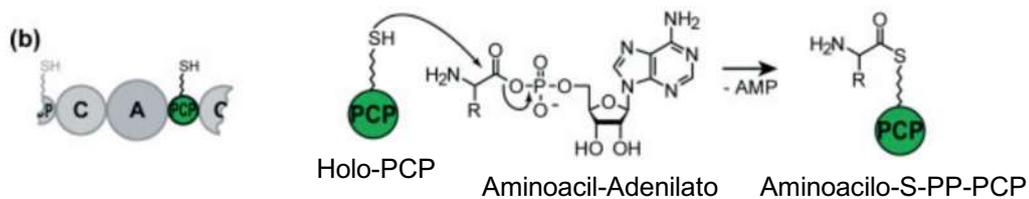


Figura 13. Reacción catalizada por el dominio PCP. Modificado de (Marahiel, 2009).

1.4.3. Dominio C

El dominio C de ~450 aminoácidos cataliza el paso final y es el encargado de formar el enlace peptídico entre el grupo carboxilo del péptido naciente y el aminoácido transportado por el módulo siguiente, lo que permite la translocación de la cadena en crecimiento a la siguiente módulo (Jaremko et al., 2020). Se plantea que la formación de enlaces peptídicos dentro del sitio activo del dominio C es iniciada por el ataque nucleofílico del grupo α -amino del sustrato aceptor sobre el grupo tioéster del sustrato donante, formando un enlace amida y la transferencia del péptido completo desde el sitio donante aguas arriba hasta el sitio aceptor aguas abajo. El péptido alargado luego sirve como sustrato donante en un paso de condensación posterior catalizado por el dominio C del siguiente módulo (Marahiel & Essen, 2009).

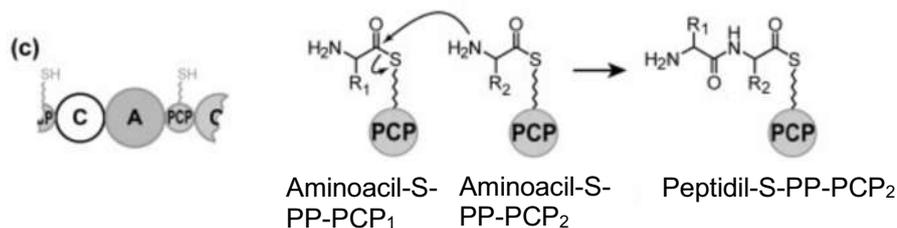


Figura 14. Reacción catalizada por el dominio C. Modificado de (Marahiel, 2009).

1.4.4. Dominio TE

La terminación del péptido es realizada por un dominio con actividad de tioesterasa de ~280 aminoácidos, este dominio solo se encuentra en el módulo final de la NRPS. La liberación del producto es realizada en dos pasos, la cadena peptídica final unida al PCP es transferida al dominio activo TE por la formación de un intermediario acil-O-TE que se escinde mediante macrociclización estereoselectiva. Algunos dominios TE catalizan la liberación de productos mediante la generación de productos cíclicos o cíclicos ramificados, mientras que otros catalizan la liberación de productos mediante hidrólisis (Izoré & Cryle, 2018).

1.5. NRPS en *Pseudomonas aeruginosa*

Una búsqueda en el genoma de *P. aeruginosa* reveló la presencia de genes que codifican para NRPS, mediante el algoritmo BLASTp; se utilizó la secuencia proteica de AusA que codifica

para un NRPS de dos módulos y que biosintetiza los dipéptidos cíclicos ciclo(L-Phe-L-Val) ciclo(L-Tyr-L-Val) y ciclo(L-Leu-L-Val) en *Staphylococcus aureus*, de 36 candidatos, fueron seleccionados 10 genes que cumplían con las características de una NRPS (Tabla 1.)(González et al., 2017).

ORF	Producto	Dominios	# Módulos	# AA
PA2402	Pioverdina sintetasa J, PvdL	C-X-Aa-T-C-C-Aa-T- C-X-Aa-T-C-C-Aa-T	4	5149
PA2424	Pioverdina sintetasa L, PvdL	A-T-C-X-Aa-T-C-X- Aa-T-C-C-Aa-T	4	4342
PA2399	Pioverdina sintetasa D, PvdD	C-X-Aa-T-C-X-Aa-T- TE	2	2448
PA2400	Pioverdina sintetasa J, PvdJ	C-X-Aa-T-C-X-Aa-T	2	2157
PA3327	Probable péptido sintetasa no ribosomal	C-Aa-T-C-A-T-TE	2	2352
PA2305	Péptido sintetasa no ribosomal, AmbB	Aa-T-C	1	1249
PA4078	Probable péptido sintetasa no ribosomal	Aa-T-R	1	991
PA4225	Pioquelina sintetasa, PchF	C-NRS-A-MT-T-TE	1	1809
PA4226	Ácido dihidroaeruginoso sintetasa, PchE	F-C-NRS-A-T	1	1438
PA2302	Péptido sintetasa no ribosomal, AmbE	A-MT-T-C-T-TE	1	2124

Tabla 1. Posibles NRPS en el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos mediante alineamiento de AusA de *S. aureus*. Modificado de (González et al., 2017).

La mayoría de los genes identificados como posibles NRPS forman parte de vías metabólicas ya descritas como el grupo de proteínas PvdD (PA2399), PvdJ (PA2400), PvdI (PA2402) y PvdL (PA2424) que participan en la biosíntesis de pioverdina, el grupo de proteínas PchF (PA4225) y PchE (PA4226) participan en la síntesis de pioquelina, otro grupo conformado por las proteínas AmbB (PA2305) y AmbE (PA2302) forman parte del grupo de genes *ambBCDE* propuesto para la biosíntesis de la molécula de señalización IQS y un último grupo conformado por los ORF PA3327 y PA4078 con función desconocida (González et al., 2017).

1.5.1. NRPS AmbB

El grupo de genes *ambABCDE* se compone de un translocador de solutos transmembranal de tipo LysE (AmbA), dos mono-oxigenasas (AmbC y AmbD) y dos NRPS (AmbB y AmbE). AmbB se compone de un dominio de acetilación, un dominio de tiolación y un

dominio de condensación. AmbE se compone de un dominio de adenilación, un dominio de metilación (MT), un dominio de tiolación, un dominio de condensación, un segundo dominio de tiolación y un dominio de tioesterasa (Rojas Murcia et al., 2015).

Principalmente se ha planteado que el clúster de genes *ambABCDE* se encuentra involucrado en la biosíntesis de la señal de QS IQS (2-(2-hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldehído) que al ser interrumpido, produce la disminución en la señal de QS PQS y C4HSL y el factor de virulencia piocianina y elastasa (Lee et al., 2013).

Posteriormente se ha reportado que en realidad los genes *ambABCDE* participan en la producción del antimetabolito ácido L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenóico (AMB) ya que el producto resultante de AmbB y AmbE es el tripeptido L-Ala-L-Glu-L-Ala, en el cual después las monooxygenasas modifican a L-Glu en AMB que es liberado tras escindir los residuos de L-Ala restantes y así la molécula de AMB es transportada por AmbA (Rojas Murcia et al., 2015).

Mientras que el autoinductor IQS también conocido como aeruginalaldehído, es un derivado de la biosíntesis de la pioquelina (Ye et al., 2014).

1.6. Ciclodipéptidos (CDPs)

Como se ha descrito anteriormente, las bacterias dependen de la coordinación de QS para producir factores de virulencia y metabolitos secundarios como antibióticos, los organismos eucariotas y procariontes suelen producir inhibidores químicos para degradar o bloquear las señales de QS como una estrategia competitiva, esto ha conllevado a la búsqueda de productos naturales que puedan ejercer estas funciones. En esta búsqueda se han empleado métodos para la detección de los agentes moduladores de QS como bioensayos empleando cepas reporteras con el operón estructural *luxCDAB* de *V. fischeri* que emiten luminiscencia en respuesta a AHL. De este modo se lograron identificar nuevas moléculas de señal de sobrenadantes de bacterias Gram-negativas, identificadas como CDPs que pueden modular la actividad de sistemas de tipo LuxIR que se creían específicos para AHL (Campbell et al., 2009).

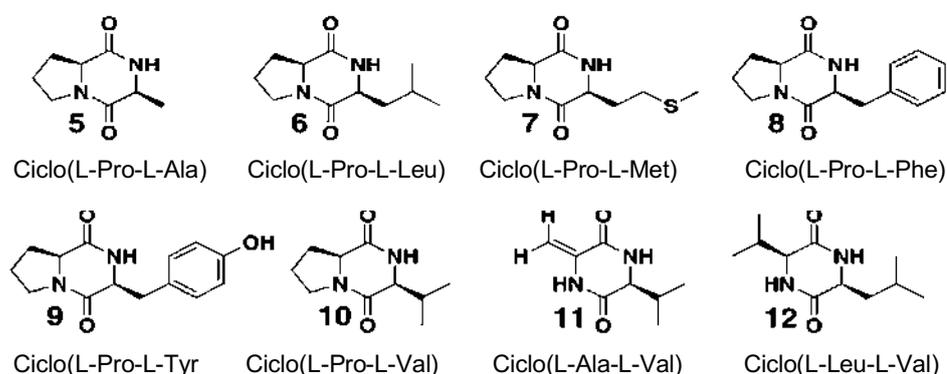


Figura 15. Ciclodipéptidos moduladores de proteínas tipo LuxR, aislados de sobrenadantes de las bacterias *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. alcaligenes*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter agglomerans*, *Vibrio vulnificus* y *Citrobacter freundii*. Modificado de (Campbell et al., 2009).

Los dipéptidos cíclicos, también conocidos como 2,5-dioxopiperazinas, 2,5-dicetopiperazinas o ciclo(dipéptidos) son las moléculas sencillas cíclicas naturales más simples, comúnmente biosintetizadas por una gran variedad de organismos vivos (Prasad, 1995). Estudios recientes han demostrado que estas moléculas presentan diversas actividades biológicas como antibacteriana, antifúngica, antiviral y antitumoral; algunos CDPs pueden formar nuevas moléculas de señal involucradas en la comunicación intercelular (Y. Wang et al., 2022). La mayoría de las vías biosintéticas de CDPs descubiertas en *Streptomyces* y otros microorganismos son catalizadas por NRPS (Lautru et al., 2002).

Actividad biológica	CDP	Referencia
Actividad antifúngica.	Ciclo(L-Phe-L-Pro) y ciclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro), aislados de <i>Lactobacillus plantarum</i> (MiLAB 393).	(Ström et al., 2002)
Promoción de crecimiento vegetal.	Ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Phe), y ciclo(L-Pro-L-Tyr), aislados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	(Ortiz-Castro et al., 2011)
Inhibición de la formación de biopelículas en <i>Streptococcus epidermidis</i> .	Ciclo(L-Leu-L-Tyr) aislado de <i>Penicillium sp.</i> y ciclo(L-Leu-L-Pro) aislado de <i>Bacillus amyoliquefaciens</i> .	(Scopel et al., 2013)
Inhibición de la producción de violaceína dependiente de QS por <i>Chromobacterium violaceum</i> CV017.	Ciclo(L-Pro-L-Phe) aislado de <i>Marinobacter sp.</i> SK-3.	(Abed et al., 2013)
Actividad bactericida y antitumoral.	Ciclo(L-Pro-D-Arg) aislado de <i>Bacillus cereus</i> .	(Kumar et al., 2014)
Actividad anti QS contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.	Ciclo(L-Trp-L-Ser) aislado de <i>Rheinheimera aquimaris</i> .	(L. Li et al., 2023)

Tabla 2. Actividades biológicas que presentan diversos ciclodipéptidos.

Recientemente se han identificado cuatro CDPs en los sobrenadantes de la bacteria *P. aeruginosa* PAO1 ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Leu), y ciclo(L-Pro-L-Phe) que en conjunto poseen la habilidad de modular la bioluminiscencia en una cepa reportera de *E. coli* por lo que se plantea la existencia de un sistema intercomunicado de QS en *P. aeruginosa* capaz de modular la fisiología bacteriana y la virulencia en respuesta a diversos cambios

ambientales; ya que la biosíntesis de CDPs está influenciada por algunas enzimas NRPS, y la mezcla de estos CDPs podría estimular el sistema *las* mediante un mecanismo desconocido en respuesta a diversos cambios ambientales, incluida la dinámica de la densidad de población y el estrés por agotamiento de fosfato (Ahator & Zhang, 2019).

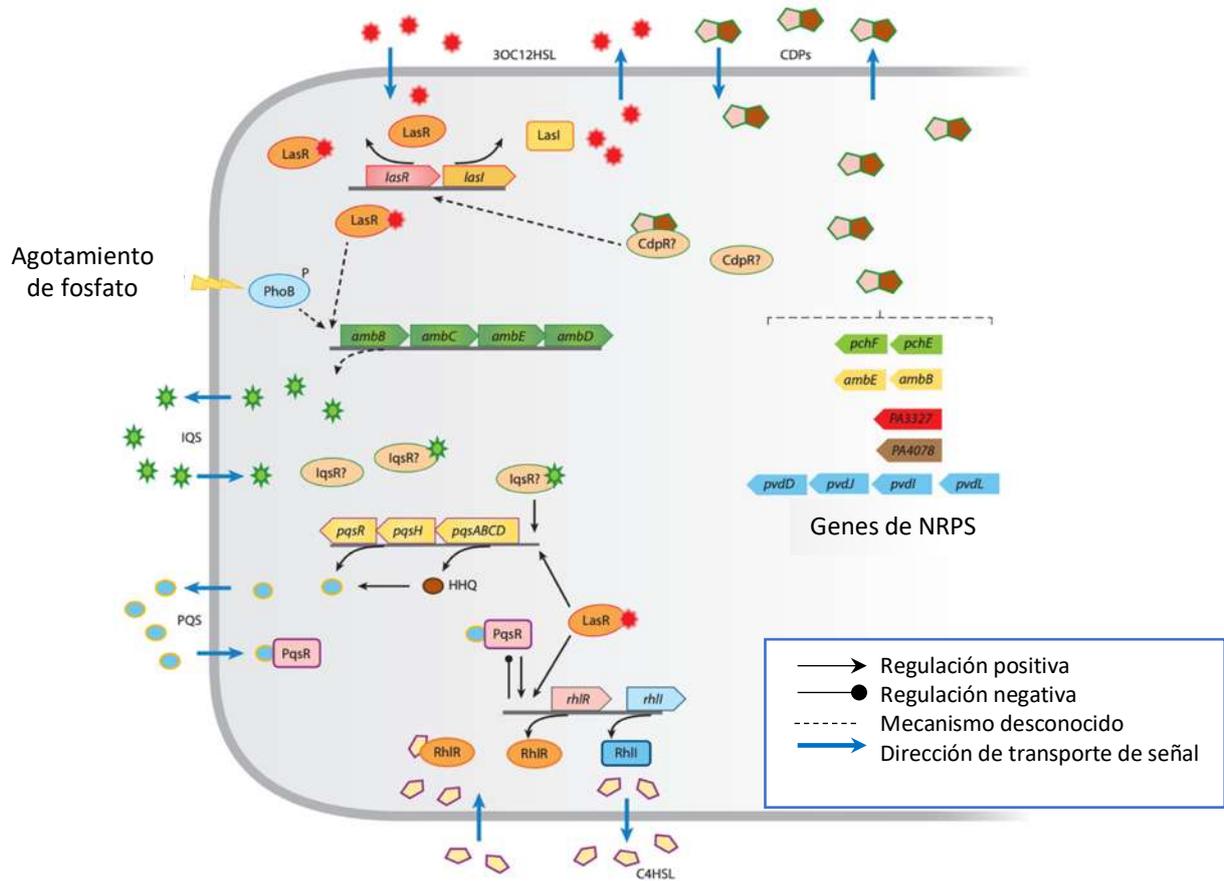


Figura 16. Sistema interconectado de QS en *P. aeruginosa*. Modificado de (Ahator & Zhang, 2019).

2. ANTECEDENTES

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que cuenta con un amplio arsenal de factores de virulencia que le permiten establecer infecciones crónicas difíciles de tratar ya que suele poseer una amplia resistencia a antibióticos, la regulación de la producción de estos factores de virulencia y estadios de infección es mediada por un complejo sistema de quorum sensing regido por los sistemas *las* y *rhl*, los cuales son modulados mediante moléculas de señalización (Lee & Zhang, 2015).

En 2011 se identificó que en *P. aeruginosa* el sistema de QS LasIR controla la producción de cuatro moléculas identificadas como CDPs, ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Phe) y ciclo(L-Pro-L-Tyr) que además mostraron actividad promotora de crecimiento vegetal, estableciendo a estos CDPs como moléculas de señalización entre los reinos eucariota y procariota (Ortiz-Castro et al., 2011).

En 2016, mediante el análisis en la producción de CDPs de una biblioteca de mutantes de *P. aeruginosa* obtenidas por transposición en genes que codifican para posibles proteínas NRPS (PvdL, PvdJ, PvdI, AmbB, AmbE, PchE, PchF, PA3327 y PA4078) se determinó que la producción de los CDPs ciclo(L-Pro-L-Tyr), (L-Pro-L-Leu), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) depende de estas enzimas NRPS, así mismo se demostró que la mezcla de estos CDPs pueden inducir bioluminiscencia dependiente de LasR tales como la 3OC12HSL (González et al., 2017). También se ha demostrado que mutaciones en las NRPS que sintetizan el sideróforo pioverdina (PvdL, PvdI, PvdJ, y PvdD), aumentan la producción de pioverdina y fenazinas como la piocianina además de que se modifica la estructura de las biopelículas, por otro lado las mutaciones en *pvdI*, *pvdJ* y *pvdL* aumentaron la supervivencia en el modelo *in vivo* del nematodo *C. elegans*, en cambio la doble mutación en *pvdI/pvdJ* aumentó su toxicidad, confirmando que algunas NRPS y sus productos modifican la virulencia de *P. aeruginosa* (Díaz-Pérez et al., 2022).

La búsqueda de compuestos anti QS continúa constantemente para encontrar alternativas al uso de antibióticos, en 2023 se analizó la actividad de los CDPs sintéticos ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Hyp) y ciclo(L-Pro-L-Phe) contra *P. aeruginosa*, donde se reportó que el ciclo(L-Pro-L-Phe), que carece de grupos hidroxilo, mostró una mayor inhibición de los factores de virulencia producidos por esta bacteria comportándose como un inhibidor de QS, demostrando así la importancia en la estructura de los CDPs para su función biológica (L. Li et al., 2023).

3. JUSTIFICACIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista de impacto en la salud pública, por lo que es importante conocer qué factores de virulencia se asocian al establecimiento de la infección. La expresión de los factores de virulencia es regulada mediante un mecanismo de comunicación en poblaciones bacterianas conocido como quorum sensing, en el cual se ha observado que moléculas conocidas como ciclodipéptidos (CDPs) pueden desempeñar un papel en la modulación de los sistemas de comunicación bacteriana. Por otro lado, se ha sugerido que los ORF PA2305/*ambB* y PA3327 codifican para enzimas del tipo péptido sintetasas no ribosomal (NRPS), que pueden estar involucradas en la síntesis de CDPs y/o moléculas que intervienen en la producción de factores de virulencia; por lo que es importante elucidar la participación de estos ORFs o de sus productos en la patogénesis de *P. aeruginosa*.

4. HIPÓTESIS

Los ORFs PA2305/*ambB* y PA3327 de *P. aeruginosa* PAO1 codifican para enzimas péptido sintetasa no ribosomal involucradas en la producción de factores de virulencia.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

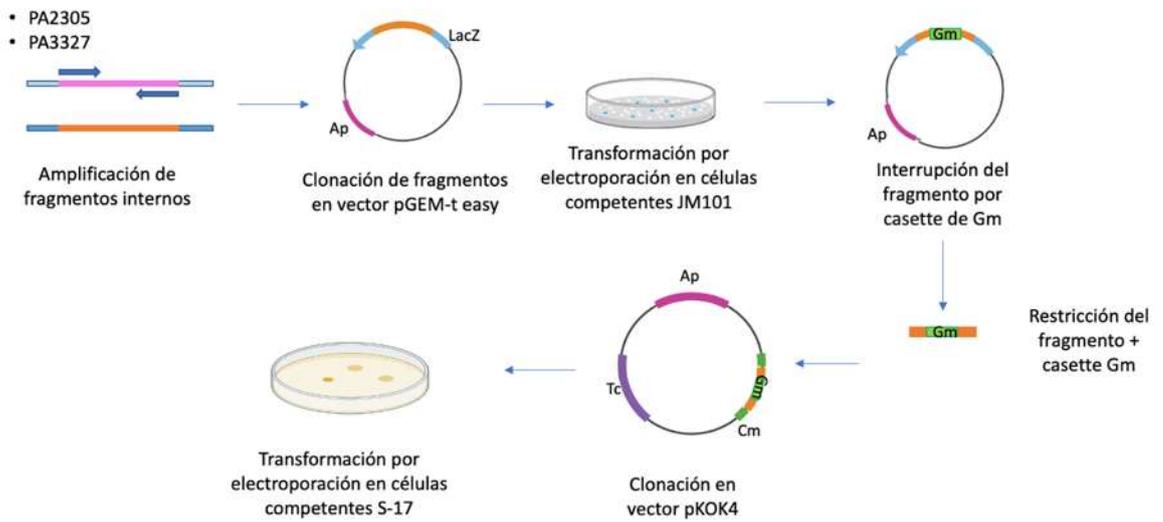
Determinar la participación de los ORFs PA2305/*ambB* y PA3327 en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1.

5.1.2. Objetivos específicos

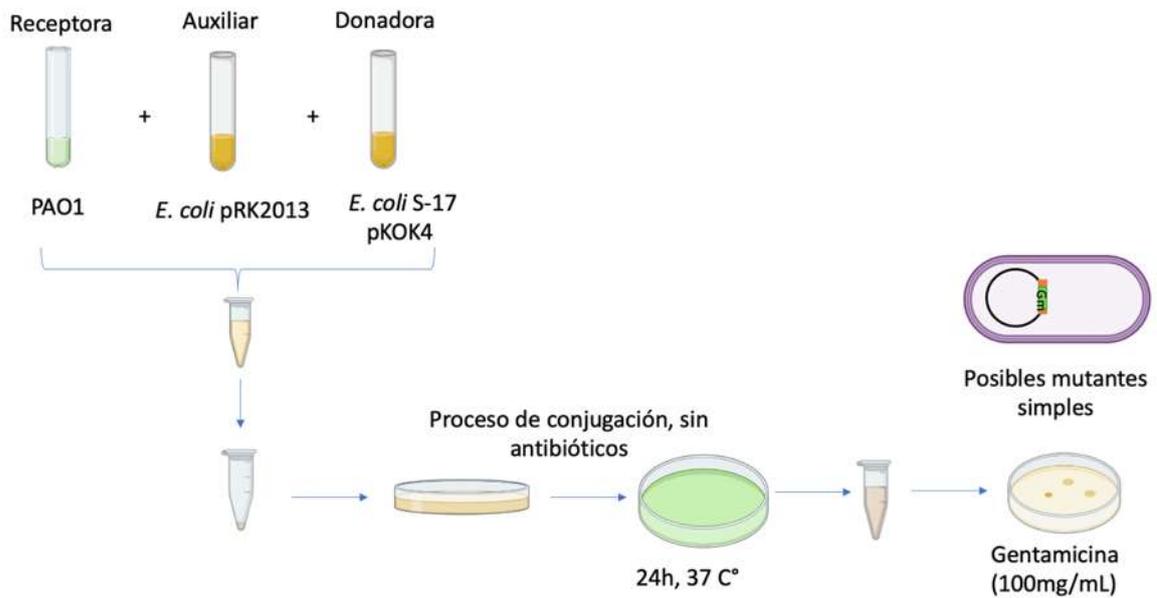
1. Evaluar el efecto de la mutación de los ORFs PA2305/*ambB* y PA3327 de *P. aeruginosa* PAO1 sobre los factores de virulencia y CDPs.
2. Determinar la participación de los ORFs PA2305/*ambB* y PA3327 en la patogenicidad de *P. aeruginosa* PAO1 en un modelo *in vivo*.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

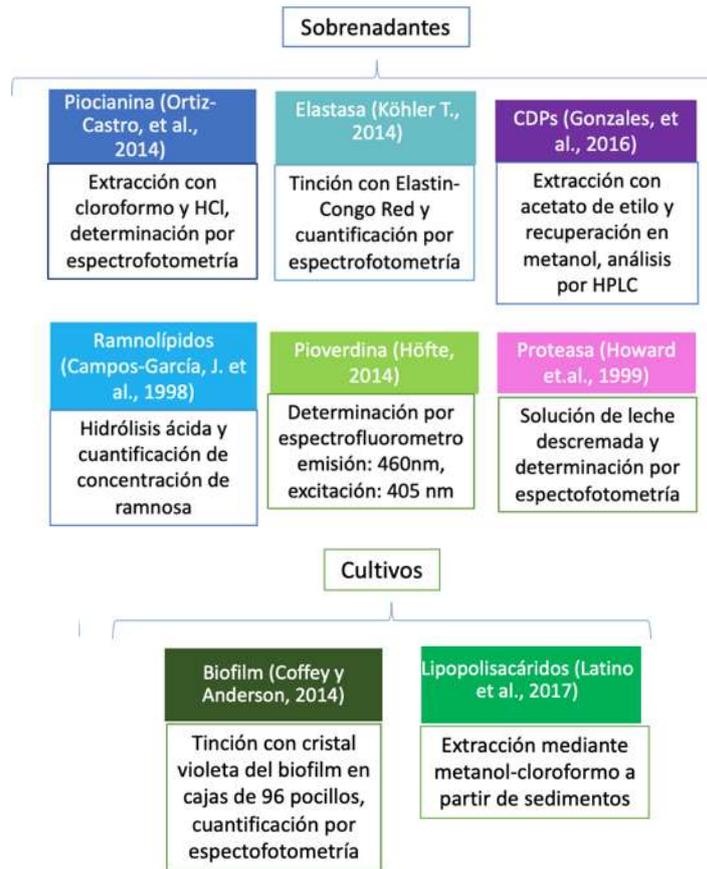
Obtención de mutantes simples



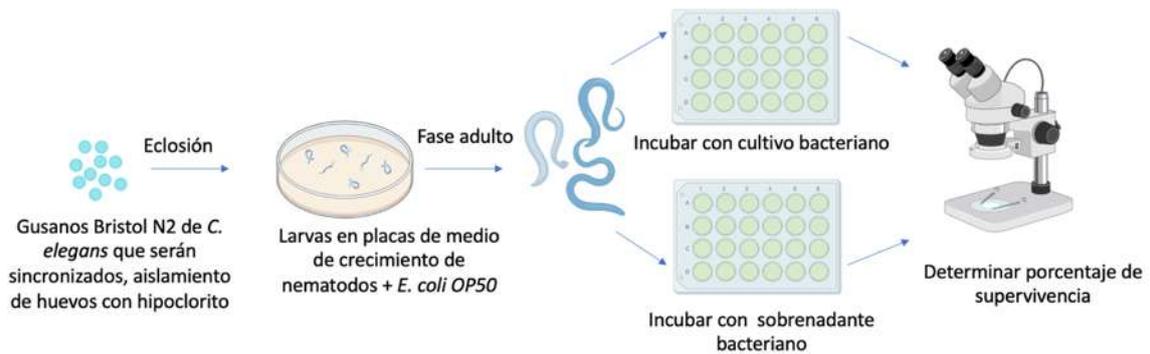
Conjugación tripartita



Determinación de producción de factores de virulencia y CDPs en cepas de *P. aeruginosa*.



Ensayos de supervivencia en *Caenorhabditis elegans*



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Materiales

Tabla 3. Material biológico.

Organismo	Características	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Cepa estándar de laboratorio	(Stover et al., 2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JM2	Cepa doble mutante en los genes <i>lasI</i> y <i>RhlI</i>	(Latifi et al., 1996)
<i>Escherichia coli</i> JM101	Cepa estándar de laboratorio para la clonación de fragmentos de ADN	(Yanisch-Perron et al., 1985)
<i>Escherichia coli</i> pRK2013	Cepa auxiliar que contiene un plásmido para la formación de pili en conjugación tripartita.	(Figurski & Helinski, 1979)
<i>Caenorhabditis elegans</i> N2	Cepa de laboratorio derivada de cepa silvestre Bristol.	(Brenner, 1974)
<i>Escherichia coli</i> OP50	Cepa resistente a estreptomicina, alimento de nematodos.	

Tabla 4. Plásmidos empleados.

Plásmido	Características	Referencia
pGEM-T easy	Vector para clonación de fragmentos AT.	PROMEGA
pBSL141	Obtención de cassette de resistencia a gentamicina.	(Alexeyev et al., 1995)
pKOK4	Vector suicida movilizable para mutagénesis dirigida.	(Kokotek & Lotz, 1991)

Tabla 5. Enzimas empleadas.

Enzima	Características
Platinum SuperFi	ADN polimerasa
Taq polimerasa	ADN polimerasa
<i>EcoRI</i> (RI)	Secuencia de corte G/AATTC
<i>MluI</i> (MI)	Secuencia de corte A/CGCGT
<i>SmaI</i> (Sm)	Secuencia de corte CCC/GGG
T4 DNA ligasa	Ligación de fragmentos de ADN

Tabla 6. Antibióticos de selección.

Antibiótico	Característica	Referencia
Streptomicina (Sm)	Marcador de selección para la cepa <i>P. aeruginosa</i> PAO1	(Stover et al., 2000)
Gentamicina (Gm)	Marcador de selección para cepas con fragmentos interrumpidos con cassette de resistencia a gentamicina	(Alexeyev et al., 1995)
Ampicilina (Ap)	Marcador de selección para cepas de <i>E. coli</i>	(Yanisch-Perron et al., 1985)
Tetraciclina (Tc)	Marcador de selección para cepa <i>P. aeruginosa</i> JM2	(Latifi et al., 1996)

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de fragmentos de dos genes de *Pseudomonas aeruginosa* PAO.

Gen	Oligonucleótido	Tamaño del fragmento en Kb	Sitio de restricción
Fragmento interno de <i>ambB</i>	FW 5'GGCGCCGTTTCGCCCCGCCGCTCCAGGC3' RV 5'GAGGTTGACGAAGCAGCCGACCAGCCC3'	1.2	<i>MluI</i>
Fragmento interno de PA3327	FW 5'CGAAGTACGCGACCGCCTCGCCGCGCT3' RV 5'GCCGGCGAAGCCAGCGCGGCCAGCTCC3'	1.1	<i>SmaI</i>
<i>aaCC1</i>	FW 5'ACGCGTATCAAAGTGCATCACTTCTTC3' RV 5'ACGCGTCAATTCTCGAATTGACATAAGC3'	0.8	-
<i>ambB</i> gen completo	FW 5'CGCCGTTGCAGGGCTACTTCACC3' RV 5'GCTCCGCCGAGTCGACCTCGAA3'	4.3	-
PA3327 gen completo	FW 5'CGCGACGCAGGTTTCCCGGAAC3' RV 5'GGTGAGGAACCGCAGCGAGTCGA3'	7.5	-

Medios de cultivo

Medio Luria-Bertani (LB)

1.0 g Peptona de caseína

0.5 g Extracto de levadura

0.5 g NaCl

H₂O destilada cbp 100 mL

Se agregaron 1.5 g de agar bacteriológico para medios sólidos

Se esterilizó a 15 libras de presión a 121 °C por 20 minutos

Medio mínimo M9

Buffer de fosfatos 20X

120 g K_2HPO_4

60 g KH_2PO_4

10 g NaCl

20 g NH_4Cl

H₂O destilada cbp 1 L, ajustar pH a 7.4

Se esterilizó a 15 libras de presión a 121 °C por 20 minutos.

Para medio sólido se preparó:

1.5 g agar bacteriológico

Cbp 100 ml de H₂O destilada

Soluciones:

5 ml Buffer de fosfatos 20X

2 ml $MgSO_4$ 1M

10 ml Glucosa 20%

0.1 ml $CaCl_2$

2.5 ml Trazas metales

Se esterilizó a 15 libras de presión a 121 °C por 20 minutos.

Medio de cultivo sólido de nematodos (NGM) para mantenimiento

0.2 g NaCl

0.4 g Peptona de caseína

0.3 g KH_2PO_4

0.05 g $K_2H_2PO_4$

0.2 g Agar bacteriológico

H₂O destilada cbp 100 ml

Se esterilizó a 15 libras de presión a 121 °C por 20 minutos

100 μ l Colesterol (5mg/ml)

Estreptomicina (50 mg/ml)

Medio de cultivo de nemátodos (NGM) para ensayo de supervivencia

0.25 g Peptona de caseína

0.2 g NaCl

H₂O destilada cbp 100 ml

Se esterilizó a 15 libras de presión a 121 °C por 20 minutos

100 μ l $MgSO_4$ 1 M

2.5 ml KH_2PO_4 1M pH 6

100 μ l Colesterol (5mg/ml)

Medio Muerte lenta (SK)

0.3 g Peptona de caseína
0.3 g Peptona de caseína
H₂O destilada cbp 100 ml

Se esterilizó a 15 libras de presión a 121 °C por 20 minutos

100 µl MgSO₄ 1 M
2.5 ml KH₂PO₄ 1M pH 6
100 µl CaCl₂ 1 M
100 µl Colesterol (5mg/ml)

Medio S Basal

0.55 g para preparar NaCl 0.1 M
0.68 g KH₂PO₄ para preparar 0.5 M
H₂O destilada cbp 100 ml

Medio S Basal suplementado

100 ml medio S Basal
100 µl Colesterol (5mg/ml)

Medio Muerte Líquida (LK)

1 parte de Medio SK
1 parte Medio S basal suplementado

7.2. Métodos

Extracción de ADN total bacteriano

Para la extracción de ADN bacteriano cromosomal se cultivó la bacteria de interés en 3 ml de medio líquido LB, a partir de una sola colonia previamente seleccionada en medio LB sólido con el antibiótico de selección correspondiente, incubar a 30 °C por 12 a 18 hrs en rotación. Se cosecharon las células en tubos eppendorf de 1.5 ml centrifugando (12 mil rpm/1 min.) y decantando el sobrenadante hasta terminar los 3 ml de cultivo.

La pastilla de células se re-suspende en 450 µl de solución TE 50/20, se agregan 10 µl de lizoenzima (40 mg/ml) se incuba a 37°C por 30 minutos. Posteriormente se agregan 50 µl de proteinasa K (20 mg/ml) se lleva a incubación nuevamente a 37°C por 15 minutos. Después de agregan 50 µl de SDS al 10% y se incuba 30 minutos a 37 °C, pasado el tiempo se incubación se agregan 100 µl de NaCl 5M se agita 15 minutos con ayuda de un vortex.

Calentar un baño seco a 65 °C para después colocar el tubo eppendorf con la muestra y adicionar 80 µl de CTAB/NaCl a la misma temperatura e incubar por 10 minutos en el baño seco.

Posteriormente se retira del baño seco y se agrega un volumen de cloroformo frío (aproximadamente 500 µl) gota a gota, se mezcla 5 minutos en el vortex, se agregan 250 µl de Fenol:Cloroformo [1:1] y se agita nuevamente en vortex por 30 segundos aproximadamente, se extraer dos veces con el Fenol:Cloroformo, después de centrifuga por 7 minutos a 12 mil rpm,

en este paso se forman 2 fases y se recupera la fase superior (acuosa) en otro tubo eppendorf de 1.5 ml estéril y rotulado, se desecha la fase inferior.

Se realiza un lavado agregando 1 ml de Etanol:Isopropanol [60%:40%], agitar manualmente e incubar a -20°C por 10 minutos, posteriormente se centrifuga (12 mil rpm/1 min.) y se decanta el sobrenadante para después realizar un segundo lavado con 1 ml de etanol al 70% se agita manualmente y se despega la pastilla, centrifugar y decantar el etanol extrayendo lo más posible con una pipeta. La muestra se incuba a 37°C para evaporar el etanol restante por aproximadamente 7 minutos.

Posteriormente se re-suspende la pastilla en 100 µl de H₂O destilada estéril y se agregan 3 µl RNasa, se verifica la correcta extracción de ADN corriendo 3 µl de muestra en un gel de agarosa al 1%.

La muestra de ADN total puede ser almacenada a -20°C para su uso posterior.

Electroforesis

Para la verificación de tamaños de fragmentos, purificación y análisis de restricción de ADN se realizó la técnica de electroforesis que consistió en la preparación de gel de agarosa al 0.1%, disolviendo 1 g de agarosa en 100 ml de TAE 0.8 X, calentando la solución para disolver los cristales de agarosa, se adicionó la solución en la base de geles de una cámara de electroforesis, después la cámara de electroforesis se llenó con TAE 0.8 X. Posteriormente se cargan los pocillos del gel de agarosa con las muestras a analizar, mezcladas con 1 µl de buffer de carga. Para el corrimiento, la fuente de poder fue programada con 30 minutos y 130 v, ajustando estos parámetros dependiendo del grosor del gel y fragmentos de interés. La visualización del gel se realizó con bromuro de etidio diluido en agua y se fotografió con un transiluminador con luz UV.

Técnica de PCR

Se realizaron reacciones de PCR para la amplificación de los fragmentos internos de dos genes a partir del ADN total extraído de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1. Se realizó la mezcla de la reacción en tubos eppendorf de 0.5 ml donde se utilizó: 10 µl ADN molde [50 ng/µl], 1 µl de mezcla de dNTPs [10 mM], 3 µl de cada primer Forward y Reverse [10 pmol], 10 µl de Buffer 5X Super Fi, 10 µl de Enhancer, 0.5 µl de Platinum Super Fi DNA polimerasa y añadir agua cbp 50 µl.

Las condiciones de la PCR fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 98°C por 5 minutos, después se repitieron 35 ciclos conformados por: temperatura de desnaturalización 98°C por 1 minuto, temperatura de alineamiento 60°C por 1 minuto, temperatura de elongación 72°C por 1 minuto y 30 segundos y un último ciclo de elongación de 72°C por 5 minutos. Las muestras son almacenadas a -20°C.

Purificación de ADN

Para recuperar los fragmentos amplificados deseados se realiza una electroforesis de los productos de ADN corriendo los 50 µl en dos pocillos, posteriormente se recupera la banda deseada cortándola del gel con ayuda de un bisturí, una fuente de luz ultravioleta y el equipo de protección requerido.

Para la purificación se empleó el kit de purificación Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System; después de cortar la banda se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 µl y se añadieron 10 µl de la solución Membrane Binding por cada 10 mg de gel, se incubó a 65°C en un baño seco hasta que se disuelva por completo la agarosa agitando constantemente. Después se ensambla una micro columna SV en el tubo recolector y se transfiere la mezcla de agarosa fundida a la micro columna y se centrifuga (16 mil rpm/1 min). Se desecha el sobrenadante y se reinserta el tubo recolector, se añadieron 700 µl de la solución Membrane Wash con etanol añadido previamente, nuevamente se centrifuga (16 mil rpm/1 min) y se desecha el sobrenadante, se repite este paso agregando esta vez 500 µl de la misma solución y centrifugando (16 mil rpm/5 min). Después se vacía el tubo recolector y se centrifuga con la micro columna sin agregar nada para deshacerse de los restos de etanol (16 mil rpm/1 min). Para finalizar el ADN se eluyó transfiriendo la micro columna a un tubo eppendorf limpio y rotulado y se añaden 50 µl de H₂O destilada estéril incubando 1 minuto a temperatura ambiente, finalmente se centrifuga (16 mil rpm/1 min), se desecha la mini-columna y se almacena la muestra a 4°C para posteriormente analizarla por electroforesis y utilizar el marcador de peso molecular adecuado para corroborar su recuperación.

Reacción de Adenilación

Esta reacción es utilizada en técnicas de clonación TA, esta técnica se basa en la capacidad de la adenina (A) y la timina (T) en diferentes fragmentos de ADN para unirse en presencia de una ligasa. En esta reacción se mezclaron en un tubo eppendorf de 0.5 ml: 4 µl del fragmento purificado de PCR, 1 µl de Buffer de Reacción 10X, 0.4 µl de MgCl₂, 0.2 µl de dATP 10mM, 1 µl de Taq DNA polimerasa y se aforó la reacción a 10 µl. Posteriormente se incubó en baño maría a 70°C por 40 minutos.

Reacción de ligación

Para conocer la concentración del inserto (fragmento de ADN) para ligar al vector (plásmido) se utiliza la siguiente fórmula.

$$\frac{(ng \text{ de vector})(\text{tamaño del inserto en kb})}{(\text{tamaño del vector en kb})} \times \text{inserto:vector} = ng \text{ de inserto}$$

La relación inserto:vector utilizada fue 5:1.

Después de obtener las concentraciones del inserto y el vector se procede a agregar los componentes de la reacción a un tubo eppendorf de 0.5 ml. Se utilizaron: 4 µl de fragmento del gen adenilado previamente, 0.5 µl del vector de clonación pGEM-T easy (25 ng/µl), 1.0 µl de Buffer 10X T4 DNA ligasa, 0.6 µl de T4 DNA ligasa y cbp 10 µl de H₂O y posteriormente incubar por 3 horas a temperatura ambiente o 2 días a 4°C, dependiendo de las instrucciones del proveedor.

Preparación de células competentes

Es importante cuidar las condiciones de esterilidad y temperatura durante todo este procedimiento. A partir de una colonia aislada de la cepa deseada (*E. coli* JM101 o S17-1) se tomó una colonia aislada crecida en medio sólido LB, verificando que no tengan resistencia a antibióticos de rutina ya que esto puede provocar colonias falsas positivas en los siguientes experimentos, se inoculó un tubo de ensaye con 3 ml de LB líquido y se incubó a 30°C por 12 a 18 horas. A partir de este pre-inóculo ya crecido, se inoculó un matraz de 1 L con 250 ml de medio líquido LB y nuevamente se deja incubando a 37°C por 4 horas y 125 rpm, hasta que se alcance una densidad óptica igual a 1.0 a 600 nm, utilizando medio LB como blanco de lectura. Posteriormente se coloca el matraz en un baño frío para detener el crecimiento celular por 10 minutos, agitando cada 2 minutos, después las células serán cosechadas en tubos Falcon con tapa previamente esterilizados, vertiendo el cultivo, centrifugando (5500 rpm a 4°C por 10 minutos) y desechando el sobrenadante hasta terminar el cultivo.

Una vez cosechadas las células se realizan varios lavados. El primer lavado se realizó agregando 5 ml de agua fría (4°C), agitando con ayuda de un vortex, después se afora a 45 ml de agua fría y se centrifuga (5500 rpm a 4°C por 10 minutos), nuevamente se desecha el sobrenadante para realizar el segundo lavado, se agregan 5 ml de agua fría, se agita con vortex y esta vez se afora a 35 ml de agua fría y centrifugar (5500 rpm a 4°C por 10 minutos). Después de desechar el sobrenadante se realiza el tercer lavado, se agregan 5 ml de glicerol al 10% frío (4°C), se re-suspenden las células con el vortex y se afora a 35 ml de glicerol frío, se vuelve a centrifugar de la misma manera, posteriormente se tira el sobrenadante y las células se re-suspenden en 5 ml de glicerol frío juntando el contenido de los tres tubos Falcon en uno solo y aforándolo a 35 ml, se centrifuga por última vez.

Finalmente, las células se re-suspenden en 1500 µl de glicerol frío para hacer alícuotas de 100 µl de células competentes en tupos Eppendorf de 1.5 ml previamente enfriados en hielo, estas alícuotas se almacenan a -80°C para su uso posterior.

Las células tienen que ser probadas para verificar que puedan aceptar plásmidos, se toman dos alícuotas de células competentes, se toman 0.5 µl del plásmido pGEM-T easy que contiene resistencia al antibiótico ampicilina y se transforma una alícuota por electroporación como se describe en el respectivo apartado. La otra alícuota recibe el pulso eléctrico, pero no se añadió ningún plásmido. Ambas alícuotas son espatuladas en cajas Petri con medio LB suplementado con el antibiótico ampicilina (100 mg/ml). Para asegurarse que las células funcionan debe

observarse crecimiento de colonias aisladas en la caja donde fueron espatuladas las células que se les agregó el plásmido y no debe observarse crecimiento bacteriano en las que solo recibieron el pulso eléctrico sin el plásmido. Esto es el control de calidad de las células competentes.

Transformación por electroporación

Este proceso se realiza bajo condiciones de esterilidad y temperatura de 4°C (en hielo), se toma una alícuota de 100 µl con la cepa requerida de células competentes y se añaden 2 µl de una reacción de ligación que se desea clonar o bien 0.5 µl de un plásmido requerido a transformar. Esta mezcla se deposita con ayuda de una micropipeta en una celda para electroporación esterilizada. Se configura la fuente de poder para electroporar en programa manual a 2.40 kV, y se da el pulso eléctrico una vez que la celda esta correctamente colocada, se deben corroborar los valores del pulso.

Posteriormente se recuperan las células en el tubo Eppendorf y se agregan 500 µl de medio LB líquido, las células se agitan manualmente y se incuban a 37°C por 1 hora.

Transcurrido este tiempo las células electroporadas tienen que ser espatuladas con ayuda de perlas de vidrio en cajas de Petri con el medio de selección necesario. Se tiene la opción de espátular los 500 µl electroporados o realizar diluciones dependiendo de la capacidad de transformación de las células, en este trabajo se repartieron los 500 µl en dos cajas con el mismo antibiótico de selección. Las células se esparcen uniformemente esperando a que el medio se seque y se dejan incubando en las cajas de Petri a 37°C por 12 a 18 horas.

Transcurrido este tiempo se analiza el crecimiento de colonias y se seleccionan alrededor de 8 colonias para re sembrar, caracterizar las bacterias transformantes y así verificar que contengan las construcciones plasmídicas deseadas.

Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina

La recuperación y análisis del plásmido de interés consiste en crecer las células recipientes en un tubo de ensaye con 3 ml de medio LB por 12 a 18 horas a 30°C con agitación constante, transcurrido este tiempo se cosechan las células en un tubo Eppendorf estéril y rotulado, vaciando el cultivo, centrifugando (12 mil rpm/1 minuto) y desechando el sobrenadante hasta terminar los 3 ml de cultivo.

Posteriormente la pastilla es re-suspendida en 150 µl de STE con ayuda de un vortex, después de adicionan 250 µl de solución de lisis (para 1 ml de solución de lisis: 100 µl de SDS al 10%, 100 µl de NaOH 2N y 800 µl de H₂O destilada estéril), se mezcla por 15 segundos en vortex y se incuba por 10 minutos en hielo, en este paso se observa una solución transparente y viscosa. Después de agregan 150 µl de acetato de sodio 3 M y se agita en vortex para volver a incubar durante 10 minutos nuevamente en hielo, aquí se debe observar la formación de un precipitado blanco. Transcurrido este tiempo de agregarán 150 µl de Fenol:Cloroformo [1:1] y se agita en

vortex por 15 segundos, hasta formar una solución blanca. Esta mezcla se centrifuga (12 mil rpm/7 min) se aprecian 2 fases, en otro tubo eppendorf estéril recuperar cuidadosamente la fase superior (acuosa) y agregar 700 µl de etanol/isopropanol [60%/40%] y agitar manualmente. Llevar a incubación en hielo por 10 minutos, después se centrifuga (12 mil rpm/1 min) y se desecha el sobrenadante cuidando que no se deseche la pastilla de ADN, se agrega 1 ml de etanol al 70% re-suspendiendo para despegar la pastilla y centrifugando (12 mil rpm/1 min), nuevamente desechar el sobrenadante y se retira la mayoría de etanol posible con ayuda de una micropipeta, para terminar de retirar el etanol se deja el tubo abierto secando a 37°C por alrededor de 7 minutos. Para finalizar se re-suspende la pastilla en 50 µl de H₂O destilada estéril y se añaden 3 µl de RNasa.

Las muestras se analizan en electroforesis de agarosa con el marcador correspondiente y se almacenan a -20°C.

Restricciones parciales

Para el análisis de las construcciones fueron requeridas restricciones parciales de los plásmidos, en estas reacciones se mezclaron 3 µl del ADN plasmídico deseado 0.1 µl de la enzima de restricción necesitada, 2 µl de Buffer TANGO 10X y cbp 25 µl de H₂O destilada estéril para la reacción, se incubó a 37°C, monitoreando la actividad de la enzima cada 2 horas corriendo 3 µl de la reacción en un gel de agarosa al 1% y monitoreando el patrón de bandas hasta observar la banda del tamaño deseado para después purificar el ADN.

Restricciones totales

Para la obtención de plásmidos linealizados se realizaron restricciones totales, mezclando en las reacciones 50 µl del ADN plasmídico deseado, 0.3 µl de la enzima de restricción necesitada, 25 µl de Buffer TANGO 10X y cbp 250 µl de H₂O destilada estéril para la reacción, se incubó a 37°C por 24 horas. Posteriormente se corrieron los 250 µl en un gel de agarosa al 1% para cortar y purificar las bandas deseadas.

Conjugación tripartita

Esta estrategia se empleó como técnica de recombinación de ADN para la obtención de mutantes de *P. aeruginosa* PAO1. Se emplearon las siguientes cepas: *E. coli* S17-1 como cepa donadora que contiene el ADN que se desea recombinar contenido en un plásmido, *E. coli* con el plásmido pRK2013 que es la cepa auxiliar que ayuda a la cepa donadora a formar un pili para movilizar el plásmido y la cepa receptora *P. aeruginosa* PAO1.

Se inocularon 3 tubos de ensaye con 3 ml de medio LB con cada una de las cepas (donadora, auxiliar y receptora), se incubaron por 12-18 horas a 30 °C en agitación constante. Posteriormente se combinaron las cepas en diferentes proporciones: [1:1:1]; 500 µl PAO1 + 500 µl S17-1 + 500 µl pRK2013, [2:1:1]; 1000 µl PAO1 + 500 µl S17-1 + 500 µl pRK2013 y [3:1:1];

1500 µl PAO1 + 500 µl S17-1 + 500 µl pRK2013 (para obtener mutantes dobles de reemplazó la cepa PAO1 por las mutantes simples por transposición de *P. aeruginosa*). Las tres mezclas de las diferentes proporciones se realizaron en tubos eppendorf de 1.5 ml, después se centrifugaron (12 mil rpm/1 min) para empastillar las células y se re-suspende cada mezcla de las diferentes proporciones en 1mL de medio LB con ayuda de un vortex, cada mezcla de las diferentes proporciones se esparcen en tres cajas Petri diferentes con medio LB sólido, se espera 15 minutos a que se seque el medio de las mezclas y se incuban a 37°C por 12 a 18 horas con la tapa hacia arriba para evitar derrames.

Transcurrido el tiempo se forma un tapete de crecimiento bacteriano con coloración verde el cual se barre con ayuda de un asa de Henle y se cosecha en un tubo eppendorf con 1 ml de medio LB, este proceso se repite para cada caja de Petri y un tubo eppendorf para la respectiva mezcla de las tres proporciones. Después se re-suspenden las células cosechadas uniformemente y de cada mezcla se realiza una dilución [1:10] (900 ml de medio LB + 100 ml de la mezcla) y se espatularon 100 µl de la dilución con ayuda de perlas de cristal estériles en una caja Petri con medio LB + el antibiótico de selección gentamicina (100 mg/ml). Se incuban 37°C por 12 a 18 horas, finalmente se seleccionan por fenotipo las colonias de bacterias mutantes obtenidas.

Prueba de crecimiento en medio M9 con citronelol

A partir de una alícuota preparada con 1.5 g de agar bacteriológico y 95 ml de agua previamente esterilizada y derretida se adicionan 5 ml de Buffer M9 20X, 0.2 ml de MgSO₄ 1 M, 0.01 ml de CaCl₂ 1 M y 0.25 ml de trazas de metales, se mezcla manualmente y este medio se divide por mitades, 50 ml del medio son vertidos en 2 cajas Petri de cristal y a los 50 ml restantes se les adicionados con glucosa al 20% y se dividen en dos cajas Petri de plástico (utilizadas como control de preparación de medio).

Se recorta un papel filtro del tamaño de la caja de Petri y se le adicionan aproximadamente 0.5 ml del reactivo citronelol, el papel filtro se coloca en las cajas de vidrio.

Extracción de ciclodipéptidos (CDPs)

En tubos con 3 ml de medio LB se inocula una colonia aislada en su respectivo antibiótico de selección para la cepa requerida, se incubó por 12 a 18 horas a 37°C en agitación constante. Pasado el tiempo se toman 100 µl del cultivo crecido y se inoculan en matraces de 125 ml con 10 ml de medio LB, se incuban por 72 horas a 37°C y 125 rpm.

Posteriormente se separan las células por centrifugación (5500 rpm/8 min) en tubos Falcon de 50 ml y se recuperó el sobrenadante en otro tubo Falcon de 50 ml (es importante que tenga espacio la mezcla para la agitación) para obtener una mezcla [2:1] se agregaron 20 ml de acetato de etilo (0.01% ácido acético). Esta mezcla se agitó vigorosamente por 2 minutos, dejando reposar otros 2 minutos, se separó la muestra empleando un embudo de separación y se recuperó la fracción del sobrenadante para volverlo a extraer esta vez con una mezcla [1:1]

agregando 10 ml de acetato de etilo (0.01% ácido acético), agitando nuevamente por 2 minutos y recuperar la fase orgánica, una vez obtenido este extracto se evapora el solvente en un baño maría a 60°C, con ayuda de un rotavapor.

Una vez evaporado en su totalidad se agregan 500 µl de metanol dejando caer por las paredes del matraz de bola, agitando suavemente y recuperando el metanol en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, este proceso se repite añadiendo otros 500 µl de metanol y recuperando en el mismo tubo, para finalizar se afora a 1 ml de metanol de alto rendimiento de cromatografía líquida (HPLC) y se centrifuga (12 mil rpm/1 min) para deshacerse de sedimentos. Las muestras son almacenadas a 6°C.

Análisis de ciclodipéptidos por HPLC

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 × 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).

Determinación de Piocianina

En tubos con 3 ml de medio LB se inocula una colonia aislada en su respectivo antibiótico de selección para la cepa requerida, se incuba por 12 a 18 horas a 30 °C en agitación constante. Pasado el tiempo se toma 1 ml del cultivo crecido y se inoculan en matraces de 250 ml con 30 ml de medio LB, se incuban por 48 horas a 37°C y 125 rpm. Posteriormente se recupera el sobrenadante del cual se utilizarán 5 ml que se transfieren a un tubo Falcon de 50 ml (es importante que la mezcla tenga espacio para la agitación) y se agregan 3 ml de cloroformo y se incuban a temperatura ambiente por 30 minutos en agitación (se utilizó un rotor). Después se forman dos fases, se retira la fase superior que es el medio LB y se conserva la fase orgánica, se adiciona 1 ml de HCl al 0.2 N y nuevamente se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos en agitación.

Se recuperan 800 µl de la fase de HCl que se torna de una coloración rosa y se mide a una absorbancia de 520 nm (González et al., 2017).

Determinación de Pioverdina

En tubos con 3 ml de medio LB se inocula una colonia aislada en su respectivo antibiótico de selección para la cepa requerida, se incuba por 48 horas a 37°C en agitación constante, posteriormente se recupera el sobrenadante mediante centrifugación, se separaron alícuotas de 2 ml para medir la fluorescencia relativa de la pioverdina a 460 nm con una excitación de 405 nm empleando un espectrofluorómetro (Höfte et al., 1993).

Determinación de Pioquelina

En un tubo con 3 ml de medio LB se inocula una colonia aislada en su respectivo antibiótico de selección para la cepa requerida, se incuba por 12 a 18 horas a 37°C en agitación constante. Pasado el tiempo se toma 1 ml de cultivo crecido y se inoculan en matraces de 250 ml con 30 ml de medio LB, se incuban por 48 horas a 37°C y 125 rpm.

Posteriormente se recupera el sobrenadante por centrifugación del cual se transfiere 1 ml a un tubo eppendorf de 1.5 ml, se acidifica con 25 μ l de ácido cítrico (2.0 M) hasta que la muestra alcanza un pH de 3.0, después a los sobrenadantes acidificados se les añade 500 μ l de CH_2Cl_2 , se mezcló por 5 minutos en vortex, posteriormente se centrifuga (12,000 rpm/5 min) y se transfirió la fase inferior (fase orgánica) a un microtubo nuevo, posteriormente se evaporó al vacío durante 25 minutos. La pioquelina se aísla como un aceite, por lo cual se diluyeron con 1 ml de la siguiente solución: metanol:H₂O [80%:20%] Se midió la absorbancia de la mezcla obtenida a 313 nm y la cuantificación se realizó siguiendo la ley de Beer-Lambert, el coeficiente de extinción molar (ϵ) de pioquelina es 4900 M⁻¹ cm⁻¹ en MeOH / H₂O (Filloux & Ramos, 2014).

Determinación de Biopelículas

En un tubo con 3 ml de medio LB se inocula una colonia aislada en su respectivo antibiótico de selección para la cepa requerida, se incuba por 24 horas a 30°C en agitación constante. Una vez crecido el cultivo se prepara una dilución 1:50 que corresponde a una densidad óptica de 0.1 a 550 nm, de esta dilución se siembran 150 μ l en un pocillo de una placa de 96 pozos esterilizada previamente (incluyendo las respectivas repeticiones) y se incluye un control de medio LB como control y blanco de lectura, la placa se incuba por 48 horas a 37°C.

Posteriormente se realizan lavados con agua destilada estéril para retirar el medio LB y las células que no adheridas, después se agregaron 100 μ l de isopropanol a cada pozo para fijar, y se deja evaporando con la caja destapada a 37°C por 24 horas. Después se añaden 125 x de cristal violeta al 0.5% para teñir las biopelículas y se realizan lavados con agua, nuevamente se deja evaporando con la caja destapada a 37°C por 24 horas. Finalmente se añaden 150 μ l de ácido acético al 30% para solubilizar las biopelículas y cuantificar midiendo la densidad óptica en un espectrómetro a 550 nm (Coffey & Anderson, 2014).

Determinación de Elastasa

En un tubo con 3 ml de medio LB se inocula una colonia aislada en su respectivo antibiótico de selección para la cepa requerida, se incuba por 48 horas a 37°C en agitación constante. Posteriormente se recupera el sobrenadante del cual se toman 250 µl y se transfieren a un tubo eppendorf de 1.5 ml para cada muestra donde se añaden 1 ml de Buffer A (para 100 ml: 1.576 g TRIS-HCl 1 + 0.011 g de CaCl₂, pH=7.0) y 2 mg del colorante Elastin-Congo Red, después de incuban las muestras a 37°C por 24 horas con agitación constante.

Posteriormente las muestras se centrifugan (10,000 rpm/5 min) para separar el sobrenadante y se realiza una dilución 1:10 para poder determinar la absorbancia a 495 nm (Köhler et al., 2014).

Determinación de Proteasa

En un tubo con 3 ml de medio LB se inocula una colonia aislada en su respectivo antibiótico de selección para la cepa requerida, se incuba por 48 horas a 37°C en agitación constante. Posteriormente se recupera el sobrenadante del cual se toman 50 µl de sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se añadieron 950 µl de una solución estéril de leche descremada al 0.1%, se mezcló y se incubó por 1 hora a 37°C, después se determinó la absorbancia a 600 nm (Saleh et al., 2019).

Determinación de Ramnolípidos

A partir de cultivos de 48 horas de la cepa requerida se recupera el sobrenadante mediante centrifugación, se toma 1 ml del sobrenadante el cual se acidifica con HCl 6N hasta alcanzar un pH= 2.0, se incuba a 4°C por 24 horas. Posteriormente se centrifuga (10 mil rpm/1 h), se decanta el sobrenadante y la pastilla se disuelve en 300 de agua destilada, después se agregan 600 µl de Cloroformo:Metanol [2:1] y se agita por 15 a 30 minutos. Se recuperaron 600 µl de la fase orgánica (inferior) y se evapora a temperatura ambiente, se obtuvo una sustancia oleosa de tonalidad ámbar. Los ramnolípidos se disuelven en 100 µl de agua destilada para su posterior cuantificación.

Para la cuantificación se agregan 900 µl de orcinol (0.19% orcinol/ 53% H₂SO₄) y se colocan a baño maría a 80°C por 30 minutos, se dejan enfriar las muestras por 15 minutos y la absorbancia de la solución fue medida a una longitud de 421 nm, la concentración se calculó basándose en la curva estándar de ramnosa (Campos-García et al., 1998).

Determinación de Lipopolisacáridos (LPS)

Se inocularon matraces con 15 ml de medio LB con las cepas requeridas, fueron incubadas por 48 horas a 37°C a 125 rpm. Posteriormente con un isopo estéril se tomó cultivo y

se esparció en una placa Petri de 60 x 15 mm, pasadas las 24 h se cosecharon las células (en un microtubo previamente pesado) y se obtuvieron las pastillas celulares mediante centrifugación (5,000 rpm/5 min) y lavados con PBS (pH=4.0) (8500 rpm/5 min) se retiró el sobrenadante y se pesó el microtubo con la pastilla. La pastilla fue re-suspendida en 500 µl de 1X SDS-buffer, las muestras se colocaron en baño de agua a 60°C por 15 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente, después se agregaron 10 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubaron las muestras a 60°C en baño de agua por 24 h. Al día siguiente se agregaron 200 µl de fenol 5% frío y se agitaron las muestras en vortex de 10 a 15 segundos, nuevamente se incubaron en baño de agua 60°C por 15 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente, finalmente las muestras se sonicaron y se realizó una dilución agregando un volumen de agua (Latino et al., 2017).

La cuantificación se realizó midiendo los polisacáridos de la superficie mediante el método colorimétrico de ácido sulfúrico-fenol (Brimacombe et al., 2013). Los estándares empleados son una mezcla [50:50] de sacarosa:fructosa de una concentración previamente determinada. Las células se re-suspenden en 1 ml de EDTA 50 mM. Se utilizan 20 µl de LPS que se mezclan con 180 µl de agua y se agregan 100 µl fenol al 5% + 500 µl de ácido sulfúrico 93% se mezcla homogéneamente por 10 minutos, se observa una coloración café correspondiente a los carbohidratos. Se determina la densidad óptica a 490 nm, los datos fueron correlacionados con la curva de los estándares de carbohidratos.

Crecimiento y mantenimiento de *C. elegans*

Se empleó la cepa de nemátodos Bristol N2 los cuales son cultivados en cajas Petri de 60 x 15 mm en medio sólido NGM, como fuente de alimento se emplea la cepa de *E. coli* OP50, sembrada como tapete en la caja Petri.

Sincronización de *C. elegans*

Se preparó una caja del medio NGM sólido, la cual se inoculó con 250 µl de un cultivo líquido de *E. coli* OP50, la caja fue incubada a 30°C por 24 horas.

Posteriormente, se tomó una caja Petri con nemátodos en estadio de adulto que habían depositado huevos, se realizó un lavado con 3.5 ml de agua estéril agitando suavemente, el agua fue recuperada en un tubo Falcon estéril de 15 ml. Después se agregó 3 ml de la solución 1 (3 ml de cloro común para limpieza + 2 ml de agua) y 0.5 ml de la solución 2 (hidróxido de sodio 3 N), dichas soluciones deben ser preparadas en el momento. Se dejó reposar por 5 minutos agitando levemente cada 2 minutos. Esta mezcla fue transferida a 3 microtubos de 1.5 ml y centrifugada (30 segundos/1300 rpm), después se retiró el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 100 µl en los microtubos (fase donde se encuentran los huevos), se añadió 1 ml de agua estéril para realizar un lavado, nuevamente se agitó levemente y se centrifugó (15 segundos/1300 rpm), se repitió este lavado una vez más. Una vez obteniendo solo la fase de los

100 µl se añadió medio M9 y se incubaron en los microtubos a 21°C por 3 días para asegurar el proceso de sincronización. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el sobrenadante y se transfirieron los 100 µl restantes a la caja de NGM previamente inoculada con *E. coli* OP50, los nemátodos fueron observados en un estereoscopio hasta la etapa L3 de adultos jóvenes.

Ensayos de supervivencia de *C. elegans* con sobrenadantes

En una placa de 24 pozos estéril se transfirieron 1 ml de sobrenadante (filtrados con filtros de 0.2 µm) de 48 horas obtenido de las cepas requeridas, se depositaron 500 µl de medio NGM y de 10 a 20 nemátodos a cada pozo con ayuda de un microscopio estereoscópico. Los nemátodos interactuaron con el sobrenadante por 48 horas, cada 12 horas se observaban a los nemátodos y se determinó la cantidad de vivos y muertos en cada pozo, el criterio para discernir entre estos estados fue si presentaban movimiento y la forma del nemátodo.

Ensayos de supervivencia de *C. elegans* con cultivo

En una placa de 24 pozos estéril se transfirieron 1 ml de cultivo de 48 horas ajustado a una D.O de 0.1 a 600 nm de las cepas deseadas, se depositaron 500 µl de medio SK y de 10 a 20 nemátodos en cada pozo con ayuda de un microscopio estereoscópico. Los nemátodos interactuaron con el sobrenadante por 48 horas, cada 12 horas se observaban a los nemátodos y se determinó la cantidad de vivos y muertos en cada pozo, el criterio para discernir entre estos estados fue si presentaban movimiento y la forma del nemátodo.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA). Se usó el programa STATISTICA 7. Además, la prueba post hoc empleada fue Tukey para determinar la participación de las mutantes en NRPS, las diferencias estadísticamente significativas ($\alpha < 0.05$) se muestran en letras minúsculas.

8. RESULTADOS

8.1. Construcciones para la obtención de mutante de *P. aeruginosa* PAO1 en el ORF PA2305/*ambB*

Amplificación del fragmento interno del ORF PA2305/*ambB*

Los oligonucleótidos diseñados para la construcción de esta mutante mostrados en la Tabla 6 fueron diseñados para amplificar un fragmento interno del gen de alrededor de 1,200 pares de bases y que en este fragmento interno se contuviera un sitio de restricción enzimática para la interrupción del fragmento del gen con el cassette de resistencia al antibiótico gentamicina. El sitio para la interrupción empleado fue para la enzima de restricción *MluI*.

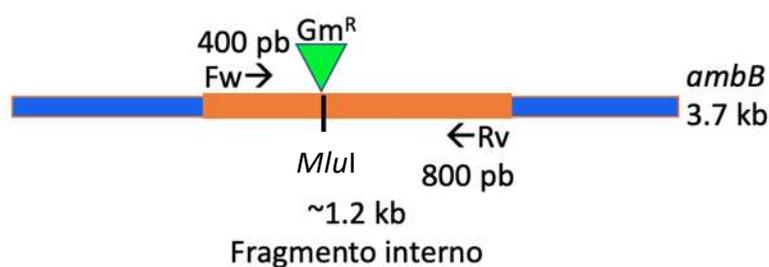


Figura 17. Oligonucleótidos diseñados para amplificación de fragmento interno de 1.2 kb del gen *ambB* de 3.7 kb.

Se realizó la amplificación de un fragmento de 1.2 kb mediante la técnica de PCR, se purificó este fragmento y se corroboró el tamaño del mismo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, logrando visualizar una banda correspondiente a este tamaño.

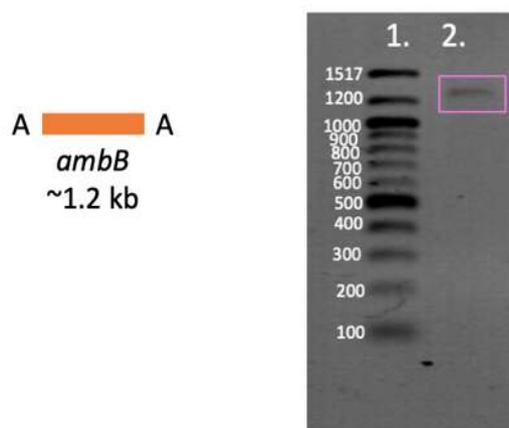


Figura 18. Purificación del fragmento interno de 1.2 kb del gen *ambB*. 1. Marcador 100 bp Ladder 2. Banda de ~1.2 kb *ambB*. Gel de agarosa 1%.

Clonación del fragmento interno del gen *ambB* de *P. aeruginosa* PAO1 en p-GEM-T easy.

Una vez realizada la purificación de la banda de 1.2 kb del gel del fragmento amplificado se realizó una reacción de adenilación (descrita en materiales y métodos) con lo que posteriormente se realizó una ligación en el vector de clonación p-GEM-T easy (3 kb), con lo que se obtuvo la construcción pGEM-T-*ambB* de 4.2 kb.

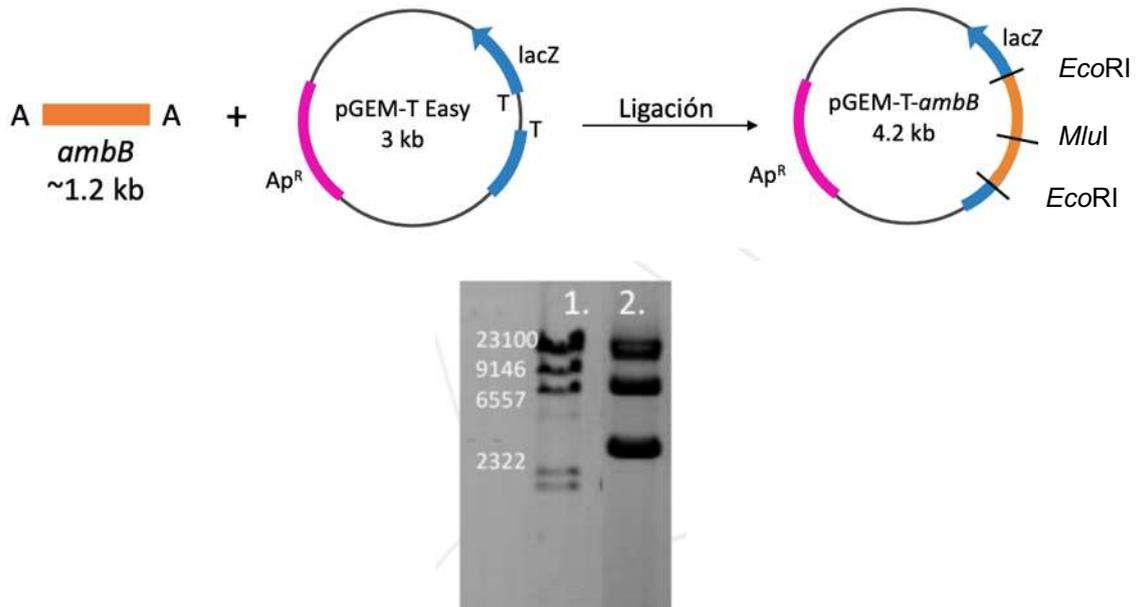


Figura 19. Clonación del fragmento de 1.2 kb del gen *ambB* en el vector pGEM-T Easy. 1. Marcador Lambda DNA/HindIII 2. Bandas correspondientes a la construcción pGEM-T-*ambB*. Gel de agarosa 1%.

Para corroborar la correcta inserción del fragmento se realizó un análisis empleando la enzima de restricción *EcoRI*, ya que el vector p-GEM-T easy posee dos sitios para *EcoRI* flanqueando el sitio de la inserción del fragmento, lo que permite visualizar en la electroforesis una banda de 3.0 kb perteneciente al vector y otra banda de 1.2 kb correspondiente al fragmento.

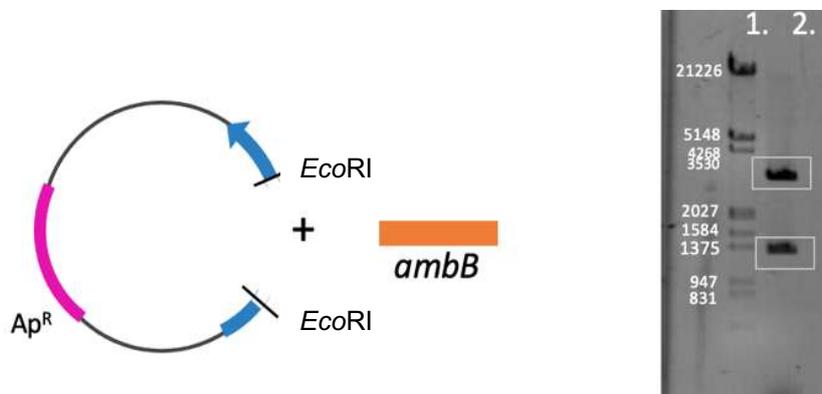


Figura 20. Verificación de inserción del fragmento en el vector p-GEM-t easy. 1. Marcador Lambda HindIII/EcoRI. 2.pGEM-*ambB*/EcoRI, bandas de 3 kb y 1.2 kb. Gel de agarosa 1%

Obtención del cassette de resistencia a gentamicina (Gm^R)

El cassette de resistencia a Gm^R fue obtenido a partir del plásmido pBSL141, aislado mediante lisis alcalina de una cepa de *E. coli*, posteriormente fue escindido mediante una restricción total con la enzima para el sitio de restricción *Mlu*I, que tiene el mismo sitio de corte para la interrupción del fragmento del gen *ambB* de *P. aeruginosa* PAO1. Posterior a la restricción total se observó una banda de 0.9 kb la cual fue cortada y purificada.

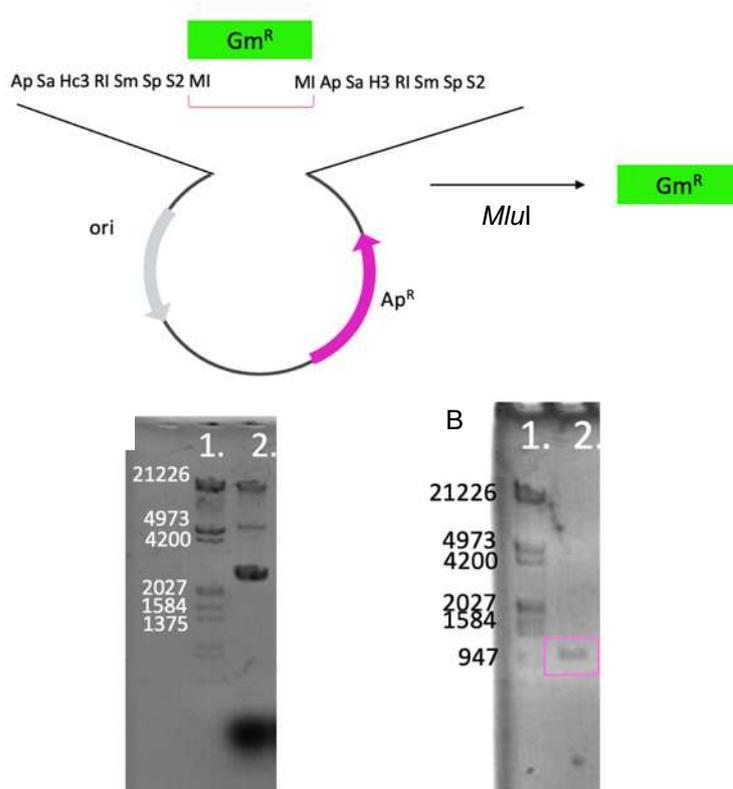


Figura 21. Obtención del cassette de resistencia a gentamicina con la enzima *Mlu*I. (A) 1. Marcador Lambda HindIII/*Eco*RI 2. Plásmido pBSL141 (B) 1. Marcador Lambda HindIII/*Eco*RI 2. pBSL141/*Mlu*I purificado. Gel de agarosa al 1%.

Interrupción del fragmento del gen *ambB* de *P. aeruginosa* PAO1 con el cassette de resistencia a Gm^R

Para realizar la interrupción en el fragmento del gen de interés, se realizó la linealización del plásmido previamente construido pGEM-*ambB* con la enzima de restricción *Mlu*I, obteniendo una banda de 4.2 kb (Figura 22). Posteriormente ya que esta construcción fue linealizada, cortada del gel de agarosa y purificada, se realizó una ligación con la enzima T4 DNA ligasa con el cassette de Gm^R previamente cortado con la misma enzima que el plásmido lineal. Después se tomaron 2 µl de la reacción de ligación y se electroporaron en células competentes de *E. coli* 101 para después aislar mediante lisis alcalina la nueva construcción pGEM-*ambB*::Gm. Las

colonias se seleccionaron en cajas con medio sólido LB suplementadas con Ap 100mg/mL y Gm 15 mg/mL.

Después de obtener la construcción pGEM-t-*ambB*::Gm se realizó un análisis de restricción empleando la enzima *EcoRI* para liberar el fragmento *ambB*::Gm del vector de clonación pGEM-T easy y verificar la correcta interrupción del fragmento, logrando observar una banda de 2.1 kb y 3.0 kb, respectivamente (Figura 24 A).

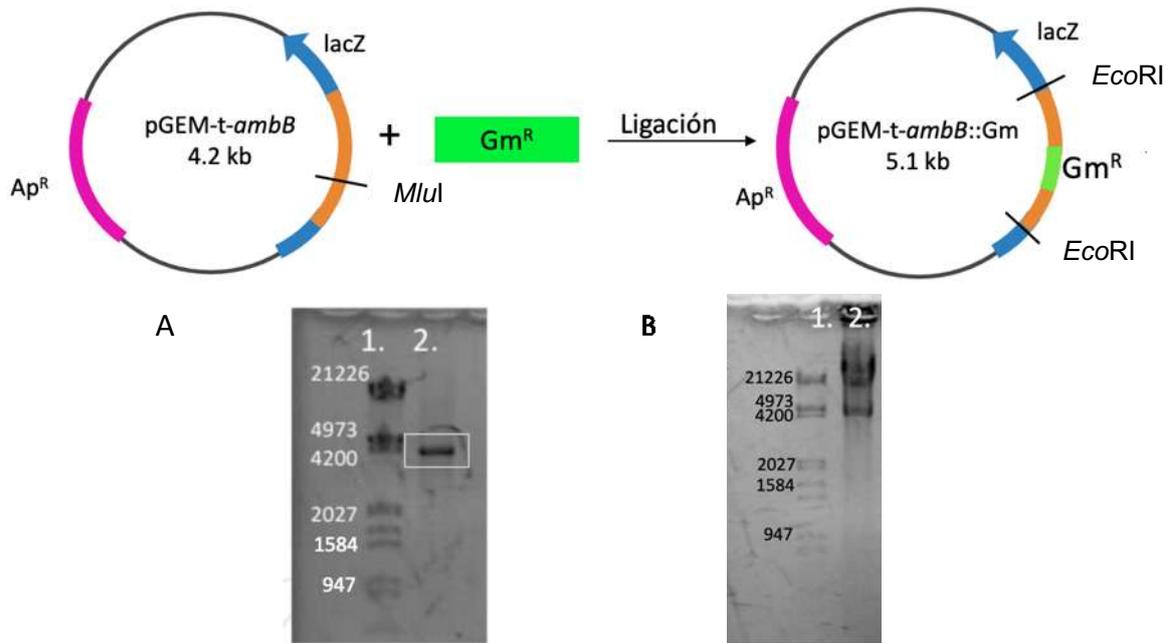


Figura 22. Ligación del cassette de resistencia a gentamicina y la construcción pGEM-t-*ambB* para obtener la construcción pGEM-t-*ambB*::Gm. (A) 1. Marcador Lambda HindIII/*EcoRI* 2. pGEM-t-*ambB* linealizado con enzima *MluI*. (B) 1. Marcador Lambda HindIII/*EcoRI*. 2. DNAp de construcción pGEM-t-*ambB*::Gm.

Subclonación del fragmento *ambB*::Gm en pKOK4

Para lograr realizar la conjugación tripartita, es necesario subclonar el fragmento del gen interrumpido en el plásmido pKOK4, ya que este plásmido es movilizable en la cepa receptora para que ocurra la recombinación homóloga y se logre transferir la información genética para así obtener una mutante simple de *P. aeruginosa* en el gen *ambB*.

El plásmido pKOK4 mide 6.3 kb y contiene genes de resistencia a tetraciclina, ampicilina y cloranfenicol, además en el gen de resistencia a cloranfenicol posee un sitio de restricción para la enzima *EcoRI* que permite que pueda ser linealizado e insertar fragmentos con este mismo sitio de corte.

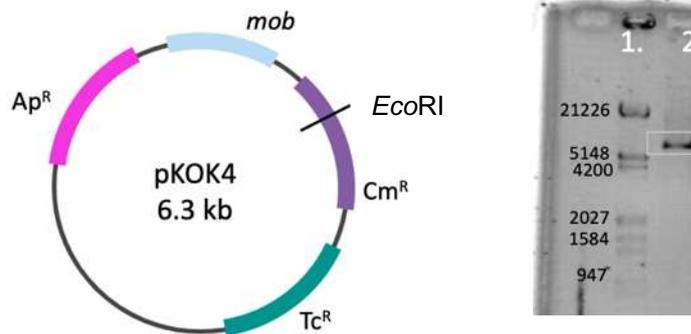


Figura 23. Linealización del plásmido pKOK4 con la enzima *EcoRI*. 1. Marcador Lambda HindIII/*EcoRI*. 2. Plásmido PKOK4 linealizado de 6.3 kb.

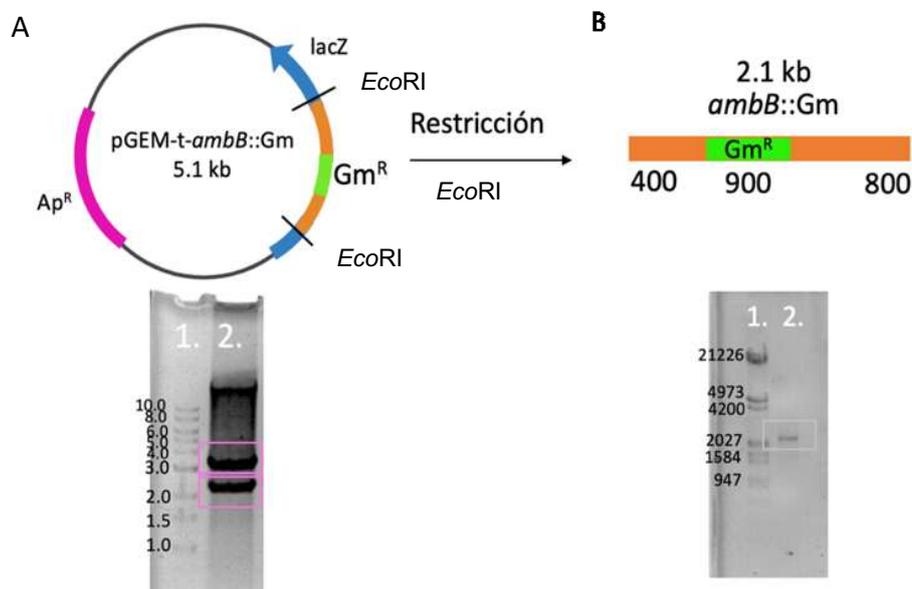


Figura 24. Análisis de restricción de la construcción pGEM-t-ambB::Gm. (A) 1. Marcador 1Kb DNA Ladder. 2. pGEM-t-ambB::Gm corte con *EcoRI*. (B) 1. Marcador Lambda HindIII/*EcoRI* 2. Fragmento *ambB::Gm* purificado, banda de 2.1 kb. Gel de agarosa 1%.

Dado que el fragmento *ambB::Gm* fue cortado con la enzima *EcoRI*, fue posible ligarlo con la enzima T4 DNA ligasa al plásmido pKOK4 linealizado, posteriormente se emplearon 2 μ l de la reacción de ligación para transformar mediante electroporación células competentes *E. coli* 101 y posteriormente realizar el aislamiento plasmídico por lisis alcalina de clonas crecidas en medio sólido LB suplementado con los antibióticos de selección ampicilina 100 mg/ml y gentamicina 100 mg/ml. Después del aislamiento plasmídico de la construcción pKOK4-*ambB::Gm* se realizó un análisis de restricción empleando la enzima *EcoRI*, observando en el gel de electroforesis una banda de 6.0 kb correspondiente a pKOK4 y otra de 1.2 kb correspondiente al fragmento *ambB::Gm*.

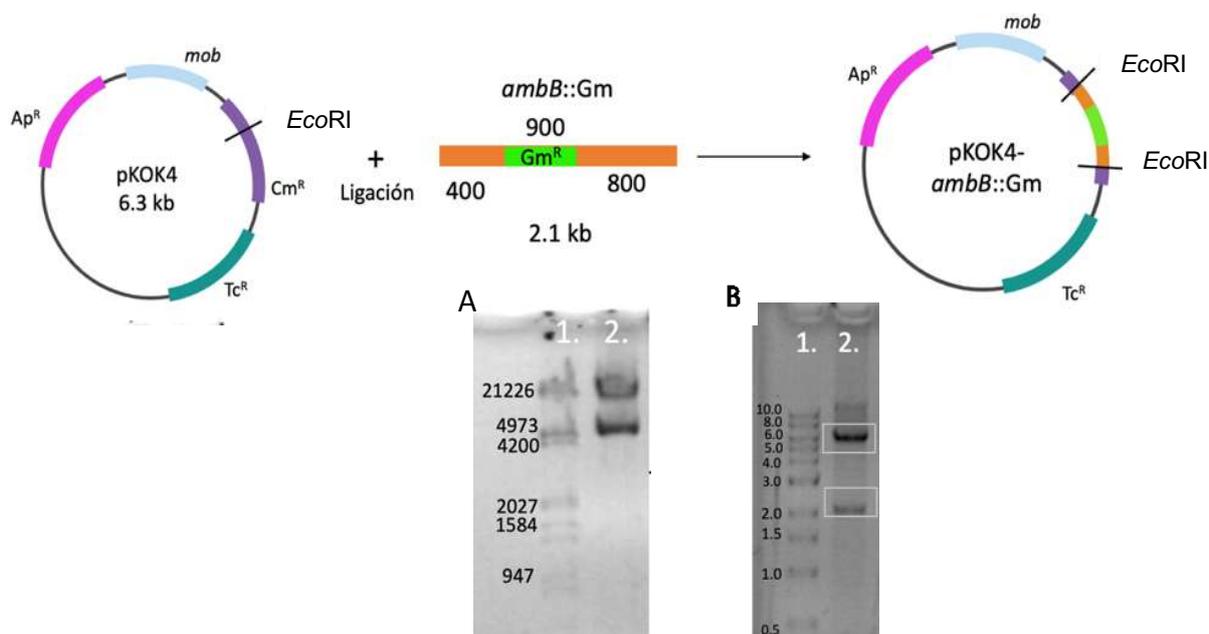


Figura 25. Subclonación de *ambB::Gm* en pKOK4. (A) 1. Marcador Lambda HindIII/EcoRI. 2. DNAP de construcción pKOK4-*ambB::Gm*. (B) 1. Marcador 1Kb DNA Ladder. 2. pKOK4-*ambB::Gm*/EcoRI, banda de 6.3 kb correspondiente a pKOK4 y banda de 2.1 kb correspondiente a *ambB::Gm*. Gel de agarosa 1%.

Por último esta construcción final pKOK4-*ambB::Gm* fue transformada mediante electroporación en células competentes de *E. coli* S-17, que fueron empleadas para la conjugación tripartita como cepa donadora. Se tomaron alrededor de 10 colonias obtenidas del procedimiento de conjugación tripartita que fueron sembradas en los antibióticos estreptomycinina (100 mg/mL) y gentamicina (100mg/mL).

8.1.1 Caracterización de la mutante simple en el ORF PA2305/*ambB*

Posteriormente a la conjugación tripartita (ver materiales y métodos) se obtuvieron alrededor de 10 colonias en un medio sólido de LB suplementado con los antibióticos de selección estreptomycinina (100 mg/mL) y gentamicina (100mg/mL), ya que este primero selecciona a la cepa *P. aeruginosa* PAO1 y el segundo selecciona a todas aquellas clonas receptoras que hayan integrado por recombinación homologa al cassette de resistencia de gentamicina empleado en la construcción final pKOK4-*ambB::Gm* en la cepa donadora. Sucesivamente, se seleccionaron 3 clonas de PAO1 con la mutación *ambB::Gm* y se sembraron en un medio de cultivo selectivo para *P. aeruginosa*, utilizando un medio mínimo M9 y se colocó en un papel filtro el reactivo citronelol, el cual puede ser usado como fuente de carbono para la especie *P. aeruginosa* PAO1 para asegurarse que se había recuperado la cepa deseada y no alguna bacteria contaminante u otra especie de *Pseudomonas*.

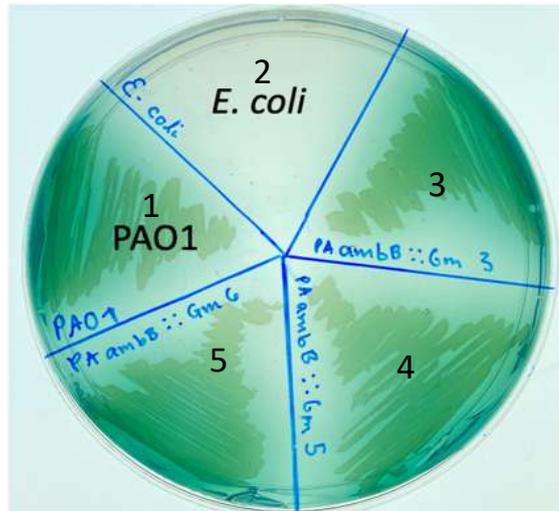


Figura 26. Cultivo de de *P. aeruginosa* PAO1 en medio mínimo M9, fuente de carbono citronelol. 1. *P. aeruginosa* PAO1. 2. *E. coli* S-17. 3. Clona número 3 de mutante simple *ambB::Gm*. 4. Clona número 4 de mutante simple *ambB::Gm*. 5. Clona número 6 de mutante simple *ambB::Gm*.

En la placa se colocó a *P. aeruginosa* PAO1 como control del correcto crecimiento de las bacterias de esta especie, se colocó también un control negativo de *E. coli* S-17 con la construcción empleada para la conjugación tripartita para asegurarse que las clonas obtenidas no eran bacterias contaminantes del proceso anterior. Así mismo se colocaron las clonas 3, 5 y 6 obtenidas de la conjugación tripartita y mutantes simples en el ORF PA2305/*ambB* las cuales presentaron un crecimiento y coloración típico de *P. aeruginosa* en presencia de la fuente de carbono citronelol a diferencia del control negativo que no presenta crecimiento.

Para continuar con la caracterización de la mutación se realizó una reacción de PCR para confirmar la presencia del cassette de resistencia a gentamicina en las clonas mutantes y descartar la existencia de este en *P. aeruginosa* de tipo salvaje.

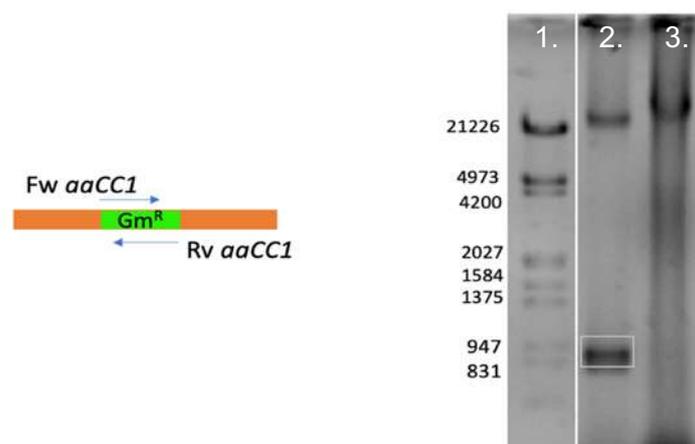


Figura 27. Amplificación del cassette de resistencia a Gm^R en el ORF PA2305/*ambB*. 1. Marcador Lambda HindIII/EcoRI. 2. Banda de ~900 pb correspondiente a Gm^R en clona mutante *ambB::Gm*. 3. PAO1 WT que no presenta Gm^R

Se confirmó mediante PCR empleando los oligonucleótidos que amplifican específicamente el cassette de resistencia a gentamicina (gentamicina 3-N-acetyltransferasa) obteniendo una banda de aproximadamente 900 pb en las clonas mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 obtenidas de la conjugación tripartita.

Otra manera de caracterizar la mutación en el gen deseado fue realizando una PCR esta vez mezclando los oligonucleótidos que amplifican el cassette de gentamicina y los que se diseñaron para amplificar el gen completo en lugar del fragmento inicial.

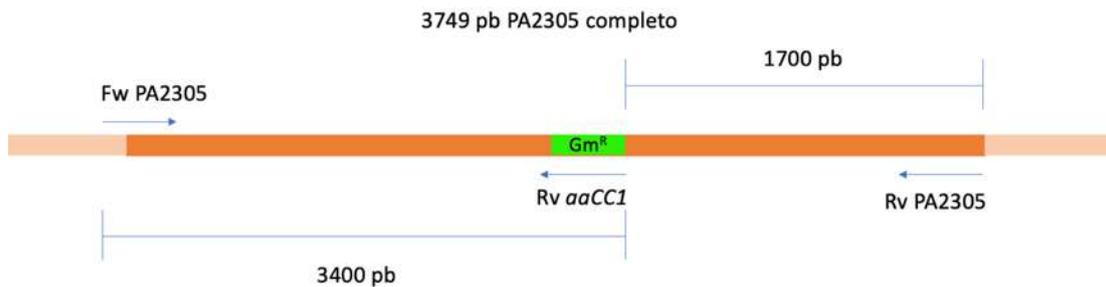


Figura 28. Diagrama de *ambB::Gm*. Se diseñaron oligonucleótidos que amplifican el gen completo de 3749 pb al cual se le insertó el cassette de resistencia a gentamicina de aproximadamente 800 pb dando un tamaño total de 4549 pb.

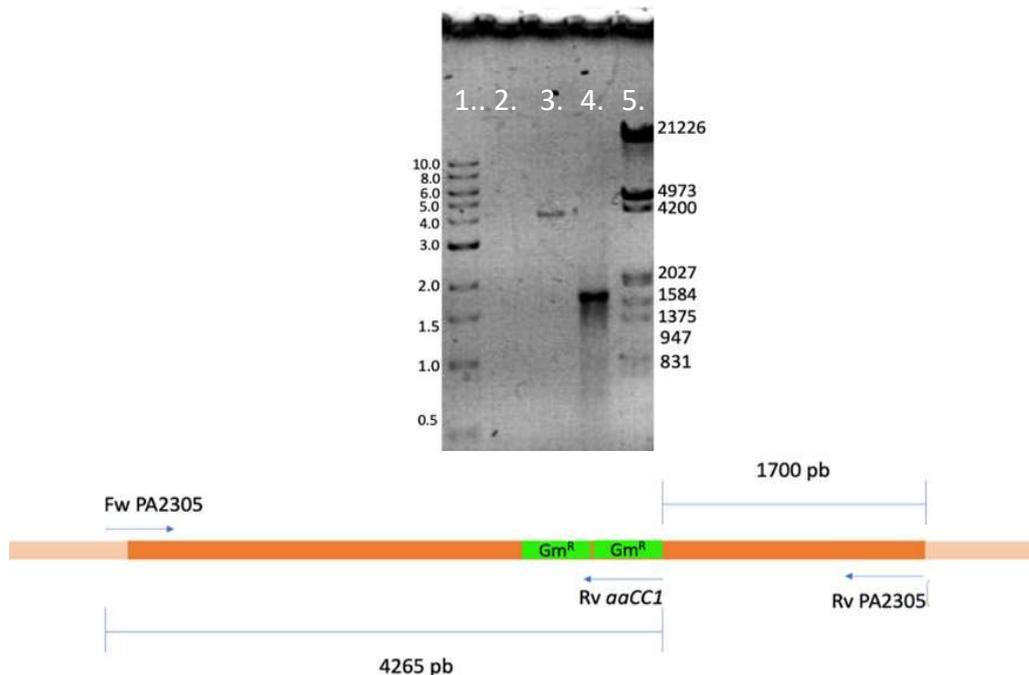


Figura 29. Comprobación de inserción de cassette de resistencia a Gm en el ORF PA2305/*ambB*. 1. 1Kb DNA ladder 2. PCR Fw PA2305 y Rv *aaCC1* en PAO1 WT 3. PCR Fw PA2305 y Rv *aaCC1* en mutante *ambB::Gm*, banda de ~4200 pb 4. PCR Rv PA2305 y Fw *aaCC1*, banda de ~1700 pb.

En una PCR se utilizó el oligonucleótido Fw PA2305 y Rv *aaCC1* empleando como ADN molde el de *P. aeruginosa* PAO1 como control, el cual no debería dar un producto ya que esta cepa silvestre no contiene el cassette de resistencia a Gm. Se realizó otra PCR con los mismos

oligonucleótidos, esta vez usando como ADN molde al de la mutante *ambB::Gm*, donde se esperaba obtener un producto de aproximadamente 3400 pb, señalando la presencia de Gm^R en el gen deseado (Figura 28).

Dados los resultados de las PCR con las combinaciones de oligonucleótidos del gen completo y el cassette Gm^R se logró identificar que en el proceso de mutagénesis de *P. aeruginosa* PAO1 se integraron dos copias de este cassette en el sitio de la enzima *MluI*, ya que originalmente se esperaba la amplificación de un fragmento de aproximadamente 3400 pb que al sumar 800 pb (tamaño de (Gm^R)) a esto nos da como resultado 4200 pb correspondientes al producto de PCR mostrado anteriormente.

8.2. Construcciones para la obtención de la mutante en el ORF PA3327 de *P. aeruginosa* PAO1.

Se realizaron los mismos pasos que para la obtención de la mutante en el ORF PA2505/*ambB* de *P. aeruginosa* PAO1, se muestran a continuación.

Amplificación del fragmento interno.

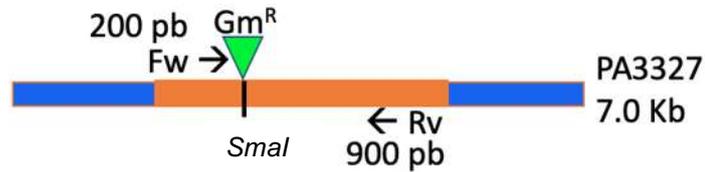


Figura 30. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación del fragmento interno de PA3327 de 1.1 kb del ORF PA3327 de 7.0 Kb.

Clonación del fragmento interno de PA3327 en p-GEM-T easy.

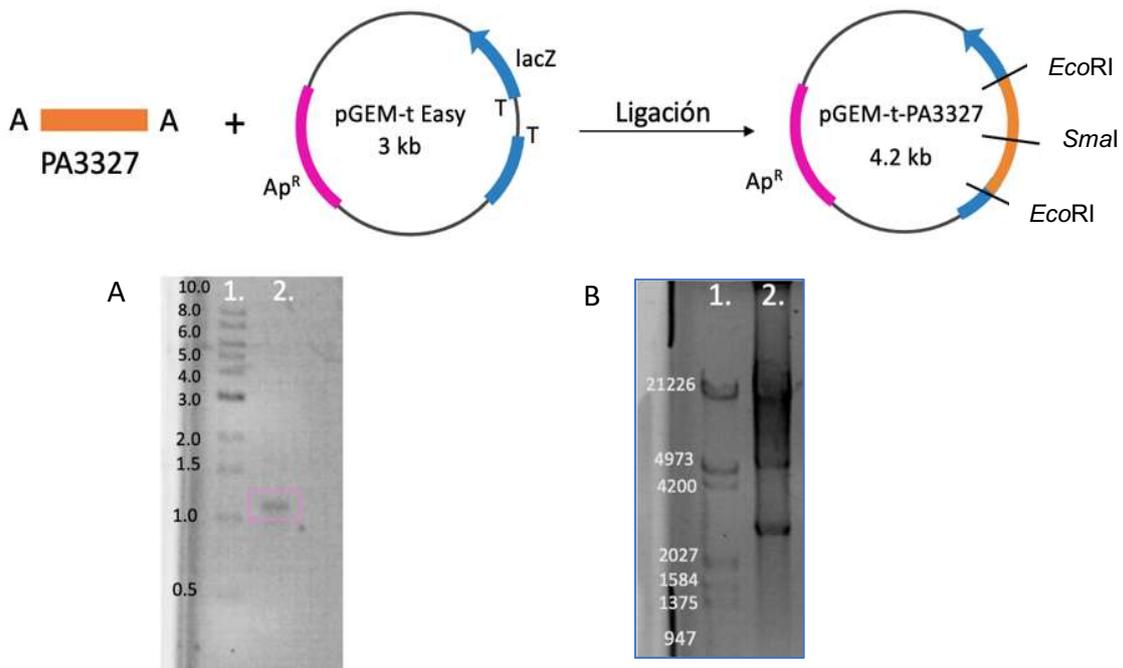


Figura 31. Clonación del fragmento de PA3327 en el vector pGEM-T Easy (A) 1. Marcador DNA Ladder. 2. Amplificación del fragmento de 1.1 kb de PA3327. (B) 1. Marcador Lambda DNA/HindIII 2. Bandas correspondientes a la construcción pGEM-T-PA3327. Gel de agarosa 1%

Verificación de la inserción del fragmento interno de PA3327 en el vector pGEM, mediante análisis de restricción con la enzima *EcoRI* que flanquea el fragmento insertado.

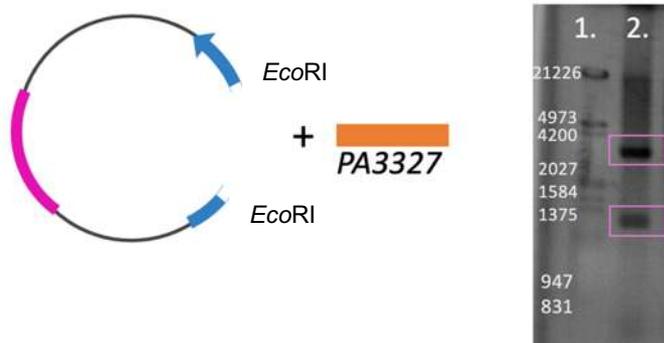


Figura 32. Verificación de inserción del fragmento en el vector p-GEM-t easy. 1. Marcador Lambda HindIII/EcoRI. 2.pGEM-PA3327/EcoRI, bandas de 3 kb y 1.1 kb. Gel de agarosa 1%

Obtención del cassette de resistencia a Gm^R

El cassette de resistencia a gentamicina fue obtenido del plásmido pBSL141 y escindido con la enzima de restricción SmaI, obteniendo una banda de aproximadamente 900 pb.

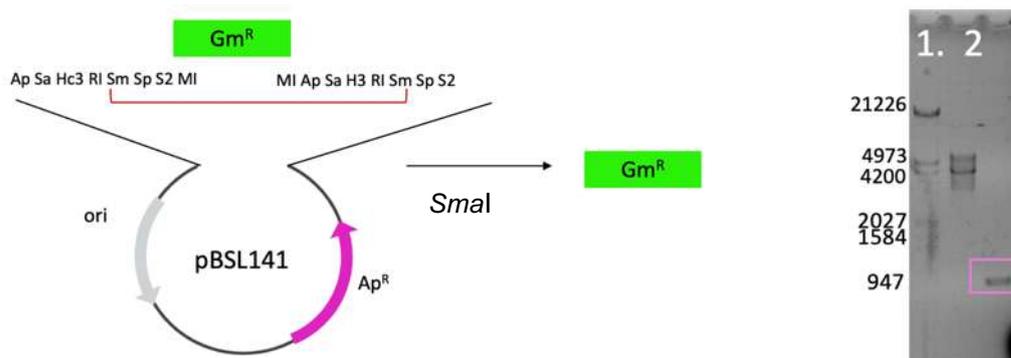


Figura 33. Obtención del cassette de resistencia a gentamicina con la enzima SmaI. 1.Marcador Lambda HindIII/EcoRI. 2.pBSL141/SmaI purificado, banda de 900 pb. Gel del agarosa al 1%.

La construcción p-GEM-T-PA3327 fue linealizada empleando la enzima SmaI la cual tiene un sitio de corte que interrumpe el fragmento de PA3327, en este sitio se insertará el cassette de resistencia a gentamicina previamente purificado en una reacción de ligación empleando la enzima T4 DNA ligasa. Esta nueva construcción p-GEM-T-PA3327::Gm fue electroporada en células JM10 *E. coli*.

Posteriormente se verificó la inserción Gm^R en el fragmento de PA3327 mediante un análisis de restricción empleando la enzima EcoRI.

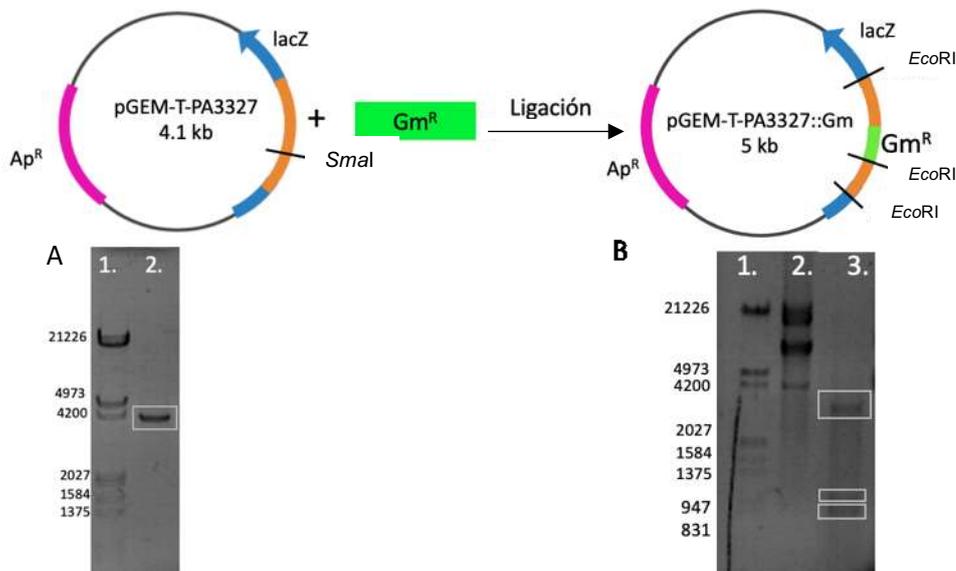


Figura 34. Ligación del cassette de resistencia a gentamicina y la construcción pGEM-T-PA3327 para obtener la construcción pGEM-t-PA3327::Gm. (A) 1. Marcador Lambda HindIII/EcoRI 2. pGEM-T-PA3327 linearizado con enzima SmaI. (B) 1. Marcador Lambda HindIII/EcoRI. 2. DNAP de construcción pGEM-t-ambB::Gm. 3. Plásmido pGEM-T-PA3327::Gm/EcoRI, banda de 3 kb, banda de 1.1 kb y banda de 0.9 kb, correspondientes a los fragmentos restantes del corte con EcoRI

Interrupción del fragmento de PA3327 con Gm^R

Posteriormente se empleó la enzima EcoRI para obtener únicamente el fragmento PA3327::Gm de 2 kb.

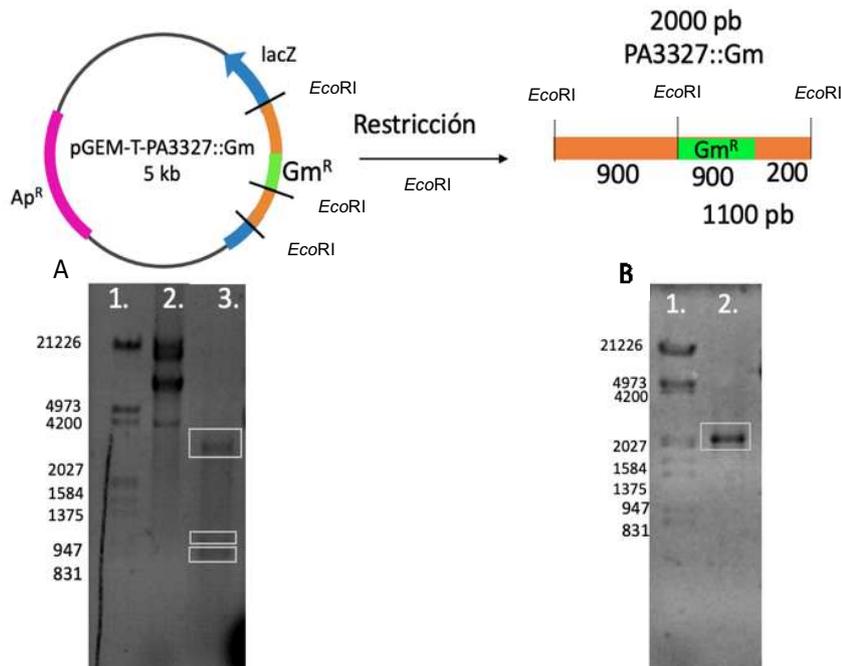


Figura 35. Análisis de restricción de la construcción pGEM-t-PA3327::Gm. (A) Lambda HindIII/EcoRI. 2. DNAP de construcción pGEM-t-PA3327::Gm. 3. Plásmido pGEM-T-PA3327::Gm/EcoRI, banda de 3 kb, banda de 1.1 kb y banda de 0.9 kb, correspondientes a los fragmentos restantes del corte con EcoRI. (B) 1. Lambda HindIII/EcoRI 2. Fragmento purificado de 200 pb correspondiente a PA3327::Gm.

Subclonación del fragmento PA3327::Gm en pKOK4

Una vez obtenido el fragmento PA3327::Gm se ligó al vector pKOK4 previamente digerido con la enzima *EcoRI* como se describe anteriormente, se electroporaron células competentes *E. coli* JM101 con la construcción pKOK4-PA3327::Gm. Posteriormente se verificó la inserción de la construcción mediante aislamiento por lisis alcalina y el plásmido obtenido fue verificado mediante análisis de restricción con la enzima *EcoRI*.

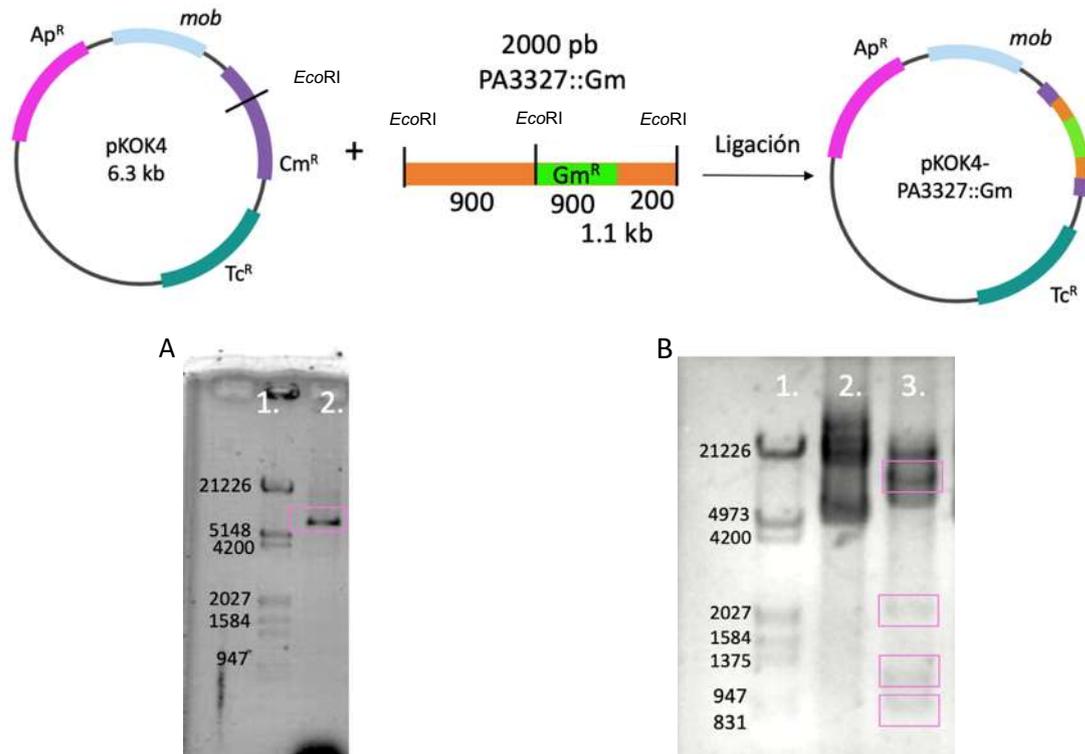


Figura 36. Subclonación de PA3327::Gm en pKOK4. (A) 1. Marcador Lambda HindIII/*EcoRI*. 2. DNAP de construcción pKOK4-PA3327::Gm. (B) 1. Marcador Lambda HindIII/*EcoRI*. 2. pKOK4-PA3327::Gm/*EcoRI*, banda de 6.3 kb correspondiente a pKOK4, banda de 2 kb correspondiente a PA3327::Gm y bandas de 1.1 kb y 0.9 kb correspondientes a los fragmentos por la digestión con *EcoRI*.

Después de verificar la correcta clonación del fragmento PA3327::Gm en el plásmido pKOK4, esta construcción fue electroporada en la cepa *E. coli* S-17 que fue empleada para el proceso de conjugación tripartita, empleando un medio de crecimiento de LB sólido suplementado con los antibióticos ampicilina (100 mg/mL) y tetraciclina (30 mg/mL). Se tomaron alrededor de 10 colonias obtenidas del procedimiento de conjugación tripartita que fueron sembradas en los antibióticos estreptomina (100 mg/mL) y gentamicina (100mg/mL).

8.2.1. Caracterización de la mutante simple en el ORF PA3327 de *P. aeruginosa* PAO1.

Posterior a la selección con antibióticos de 3 colonias obtenidas en la conjugación tripartita de de *P. aeruginosa* PAO1, se sembraron en medio mínimo M9 con fuente de carbono citronelol. Se observó el crecimiento de las clonas mutantes PA3327 al igual que el del control positivo PAO1, con lo que se continuó con la caracterización para la verificación de la inserción del cassette de resistencia a gentamicina mediante PCR y la amplificación de este, confirmando la presencia del cassette en las mutantes y el aumento en pb del fragmento original amplificado.

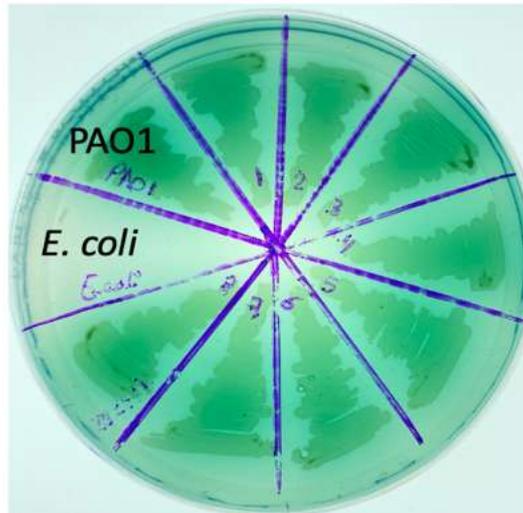


Figura 37. Cultivo de cepas de de *P. aeruginosa* PAO1 en Medio mínimo M9, fuente de carbono citronelol. 1. *P.aeruginosa* PAO1. 2. *E. coli* S-17. 3-8 Clonas 1-8 de mutantes PA3327::Gm obtenidas en conjugación tripartita.

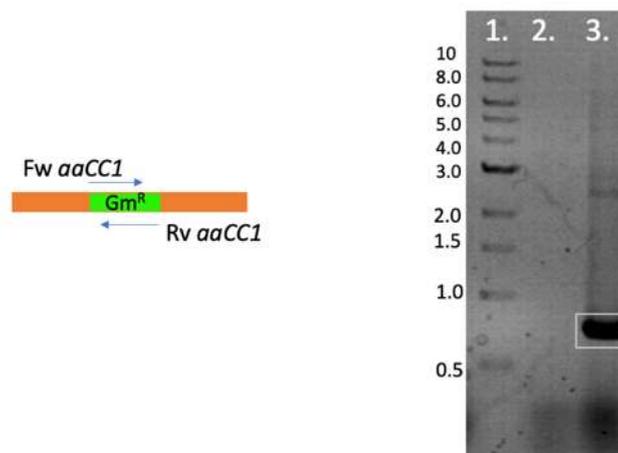


Figura 38. Amplificación del cassette de resistencia a Gm^R en el ORF PA3327. 1. Marcador 1 kb DNA Ladder. 2. PAO1 WT que no presenta Gm^R. 3. Banda de ~900 pb correspondiente a Gm^R en clona mutante PA3327::Gm.

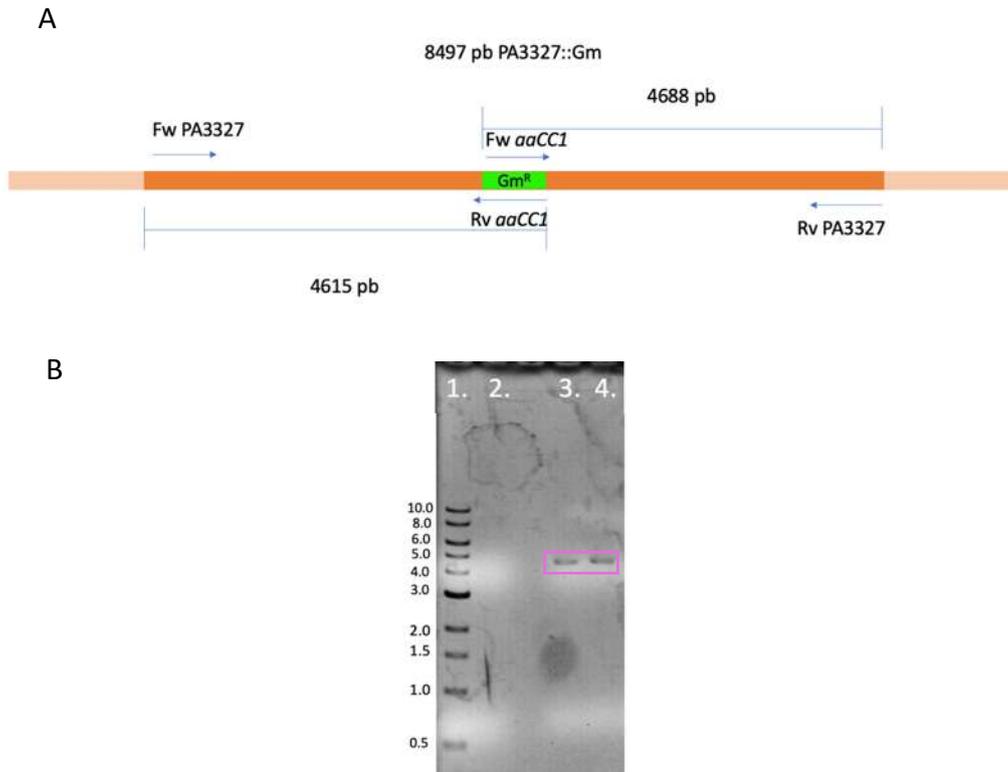
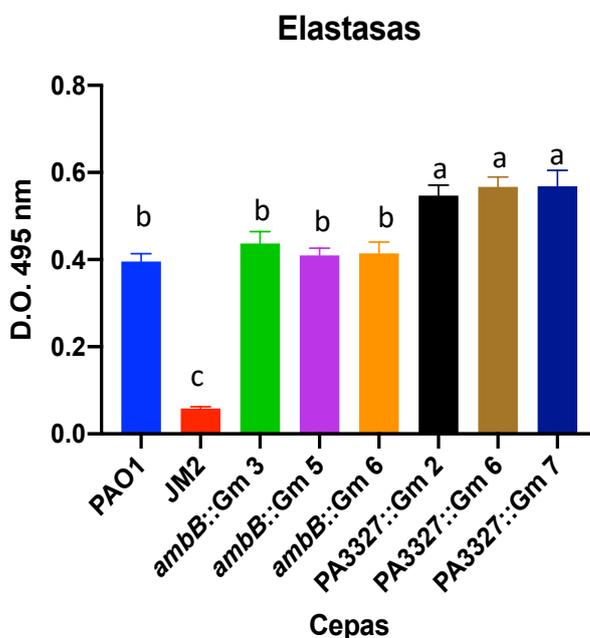


Figura 39. Comprobación de inserción de cassette de resistencia a Gm en el ORF PA3327. (A) Diagrama de la inserción de Gm^R en el ORF PA3327 y oligonucleótidos diseñados para la amplificación del ORF completo. (B) 1. Marcador 1Kb DNA ladder 2. PCR Fw PA3327 y Rv *aaCC1* en PAO1 WT, donde no se obtuvo producto de amplificación. 3. PCR Fw PA3327 y Rv *aaCC1*, fragmento amplificado de ~4615 pb. 4. PCR Rv PA3327 y Fw *aaCC1*, fragmento amplificado de ~4688 pb.

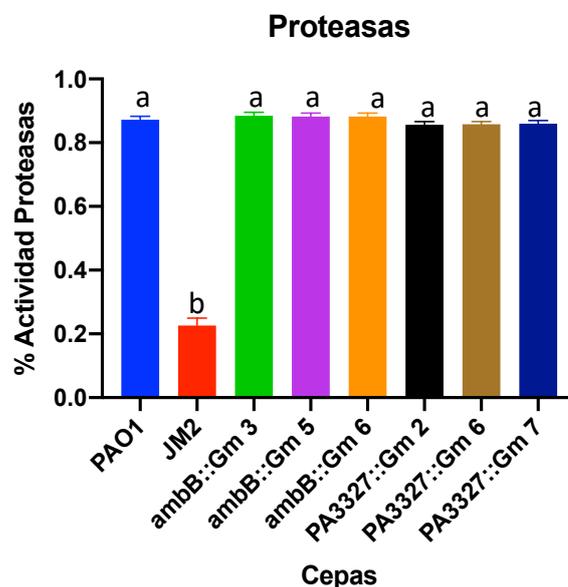
8.3. Efecto sobre la producción de factores de virulencia por mutación en las NRPS de *P. aeruginosa*.

Se evaluó el efecto de las mutaciones en los ORF PA2305/*ambB* y PA3327 sobre la producción de factores de virulencia de *P. aeruginosa*. Se tomaron 3 clones de cada mutante para verificar que el fenotipo fuera homogéneo entre mutantes. Los factores de virulencia fueron evaluados a las 48 horas en medio de cultivo LB, empleando como control positivo a *P. aeruginosa* PAO1 y como control negativo de producción de factores de virulencia a la cepa JM2 ($\Delta lasI/\Delta RhlI$).

La producción de los factores de virulencia elastasas y proteasas está principalmente regido por el sistema de QS *las*. Se observó que las cepas mutantes en *ambB* no mostraron diferencias significativas en comparación con el control PAO1, a diferencia con las cepas mutantes en PA3327 que aumentaron la producción de elastasas.



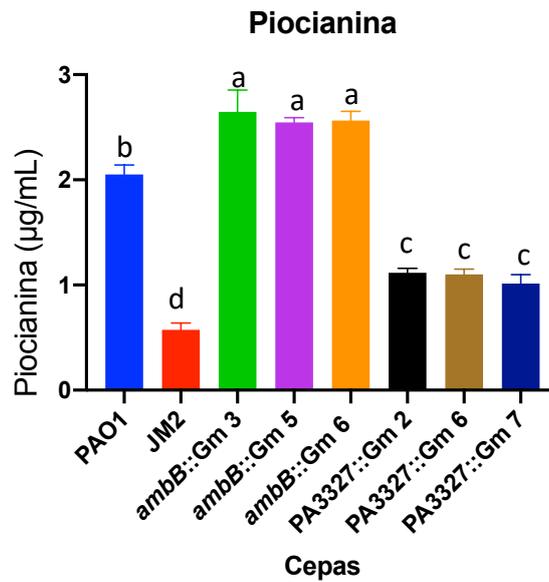
Gráfica 1. Determinación de elastasas generales producidas por las cepas de *P. aeruginosa* PAO1. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes. Se realizó análisis ANOVA de una vía, con prueba post-hoc de Tukey; $n=4$. Las letras minúsculas representan diferencias significativas.



Gráfica 2. Determinación de la actividad de proteasas producidas por las cepas de *P. aeruginosa* PAO1. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes. Se realizó análisis ANOVA de una vía, con prueba post-hoc de Tukey; $n=3$. Las letras minúsculas representan diferencias significativas.

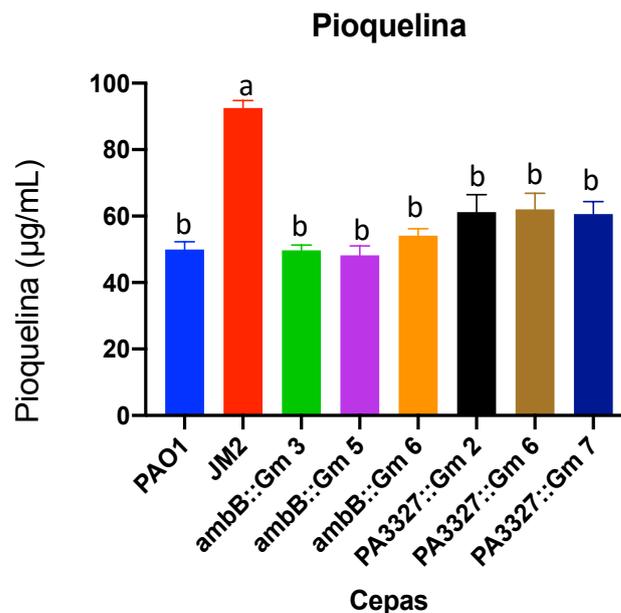
El % de actividad de proteasas no se alteró por ninguna de las mutaciones en NRPS, observando una actividad igual que a la cepa silvestre PAO1, dado que los factores de virulencia elastasas y proteasas no se vieron modificados en gran medida, se plantea que estos genes no regulan al sistema *las*, a diferencia de la doble mutante JM2 donde se abate la síntesis de estos factores de virulencia.

El factor de virulencia piocianina esta mediado principalmente por el sistema *rhl*, por lo que se evaluó la producción de este factor de virulencia en las cepas mutantes. Como se muestra en la Gráfica 3, las mutantes en *ambB* aumentaron la síntesis de piocianina a diferencia de las mutantes en PA3327 donde disminuye este factor de virulencia, sin llegar a disminuir como en la doble mutante JM2, este resultado puede indicar que los genes de estas NRPS pueden tener una actividad moduladora sobre el sistema *rhl*.



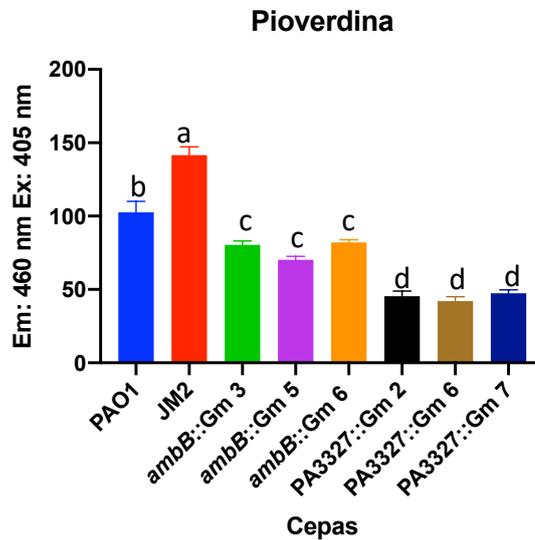
Gráfica 3. Determinación de la piocianina producidas por las cepas de *P. aeruginosa* PAO1. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes. Se realizó análisis ANOVA de una vía, con prueba post-hoc de Tukey; $n=3$. Las letras minúsculas representan diferencias significativas.

La síntesis del sideróforo pioquelina es llevada a cabo por el clúster de genes *pchDCBA* y *pchEFGHI* los cuales codifican para NRPS, este sideróforo se produce al censar una baja concentración de hierro en el ambiente. Por lo que las mutaciones en las NRPS *ambB* y *PA3327* no mostraron diferencias significativas en la síntesis de la pioverdina en comparación con el control PAO1.



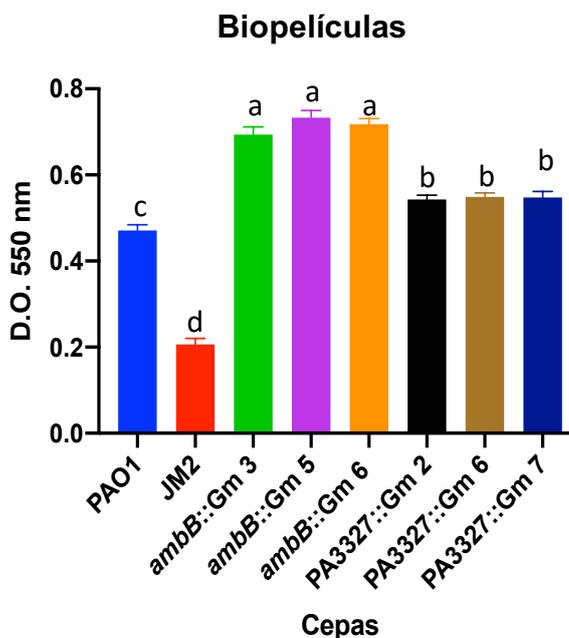
Gráfica 4. Determinación de la pioquelina producida por las cepas de *P. aeruginosa* PAO1. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes. Se realizó análisis ANOVA de una vía, con prueba post-hoc de Tukey; $n=3$. Las letras minúsculas representan diferencias significativas.

El principal sideróforo producido por *P. aeruginosa* es la pioverdina, la cual de la misma manera tiene un clúster de genes de NRPS responsables de su biosíntesis (*pvd*). La producción de pioverdina disminuyó significativamente en las mutantes en *ambB* así como también en las cepas mutantes en PA3327.



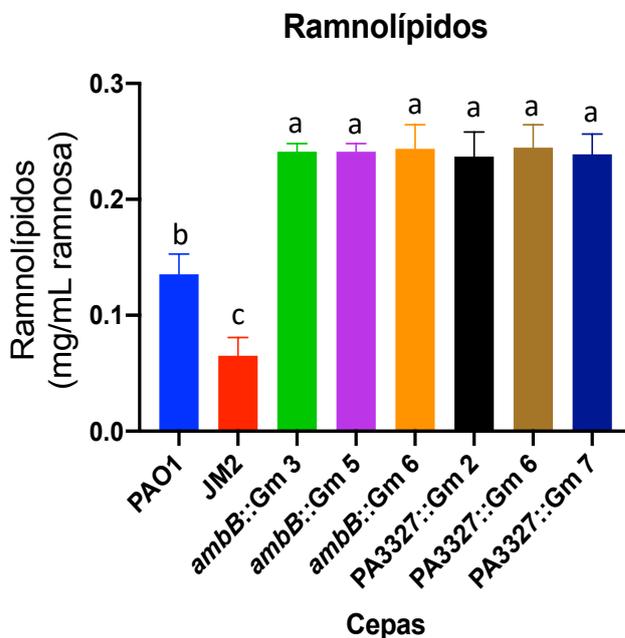
Gráfica 5. Determinación de pioverdina producida por las cepas de *P. aeruginosa* PAO1. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes. Se realizó análisis ANOVA de una vía, con prueba post-hoc de Tukey; n=12. Las letras minúsculas representan diferencias significativas

El tercer sistema de QS de *P. aeruginosa* PQS rige principalmente la biosíntesis de biopelículas, influenciado también por *rhl*.

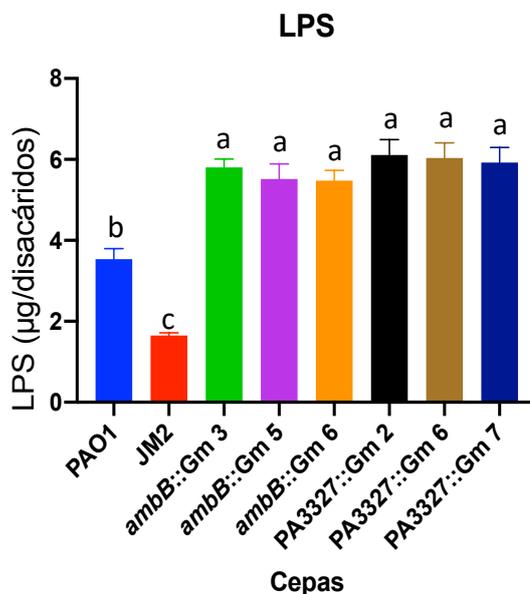


Gráfica 6. Determinación de biopelículas producido por las cepas de *P. aeruginosa* PAO1. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes. Se realizó análisis ANOVA de una vía, con prueba post-hoc de Tukey; n=12. Las letras minúsculas representan diferencias significativas.

La producción de biopelículas aumentó para ambas cepas mutantes en comparación con PAO1, teniendo un mayor aumento en las clonas mutantes en la NRPS *ambB*. Parte de los elementos principales para la correcta formación de biopelículas son los ramnolípidos y los LPS, los cuales también fueron evaluados.



Gráfica 8. Determinación de ramnolípidos producidos por las cepas de *P. aeruginosa* PAO1. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes. Se realizó análisis ANOVA de una vía, con prueba post-hoc de Tukey; $n=3$. Las letras minúsculas representan diferencias significativas.



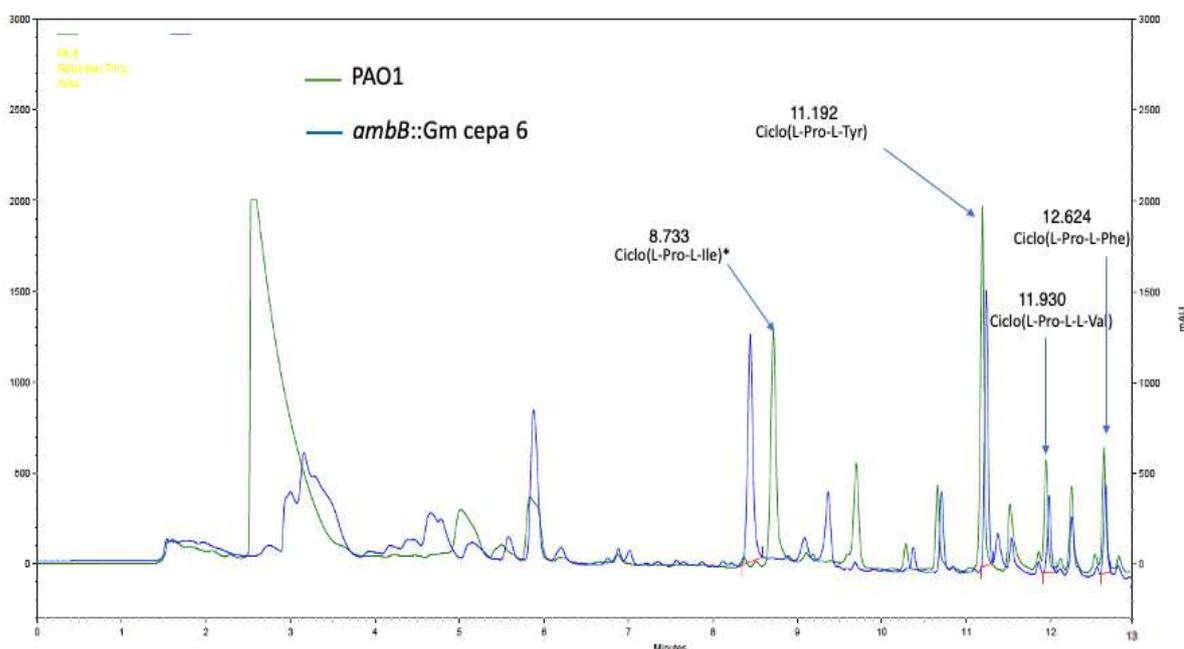
Gráfica 7. Determinación de LPS producidos por las cepas de *P. aeruginosa* PAO1. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes. Se realizó análisis ANOVA de una vía, con prueba post-hoc de Tukey; $n=3$. Las letras minúsculas representan diferencias significativas.

Concordando con el aumento de biopelículas, para ambas mutantes aumentó la producción de ramnolípidos y LPS respecto a la cepa de referencia PAO1, estos resultados podrían indicar que ambos genes de NRPS o sus productos pueden influenciar al sistema de QS *rhl* que a su vez modula al sistema PQS, ya que los principales factores de virulencia que se modificaron fueron la piocianina, biopelículas y sus componentes.

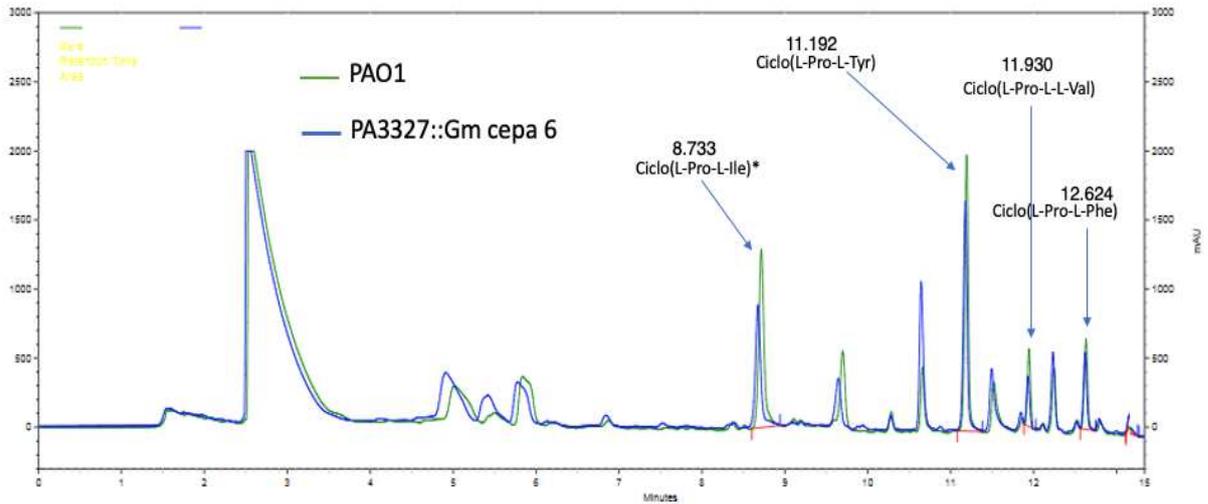
8.4. Efecto sobre la producción de CDPs por la mutación en NRPS de *P. aeruginosa*.

Como se describió anteriormente los CDPs pueden actuar como moléculas moduladoras del QS y sucesivamente modificar la síntesis de factores de virulencia, por lo que se evaluó la producción de CDPs en las mutantes en *ambB* y PA3327, además ya que estos genes codifican para NRPS que ensamblan péptidos, se analizó si la producción de estas moléculas se afectó por las mutaciones en estas NRPS.

Se realizó la extracción en acetato de etilo de CDPs a partir de sobrenadantes de cultivos de 48 h, crecidos en medio de cultivo LB.



Gráfica 9. Cromatograma obtenido del análisis por HPLC. La línea verde representa la extracción de CDPs de *P. aeruginosa* la cual se tomará como referencia. La línea azul representa la extracción de CDPs de la mutante *ambB::Gm*. Las flechas señalan el CDP identificado y el tiempo de retención en minutos.

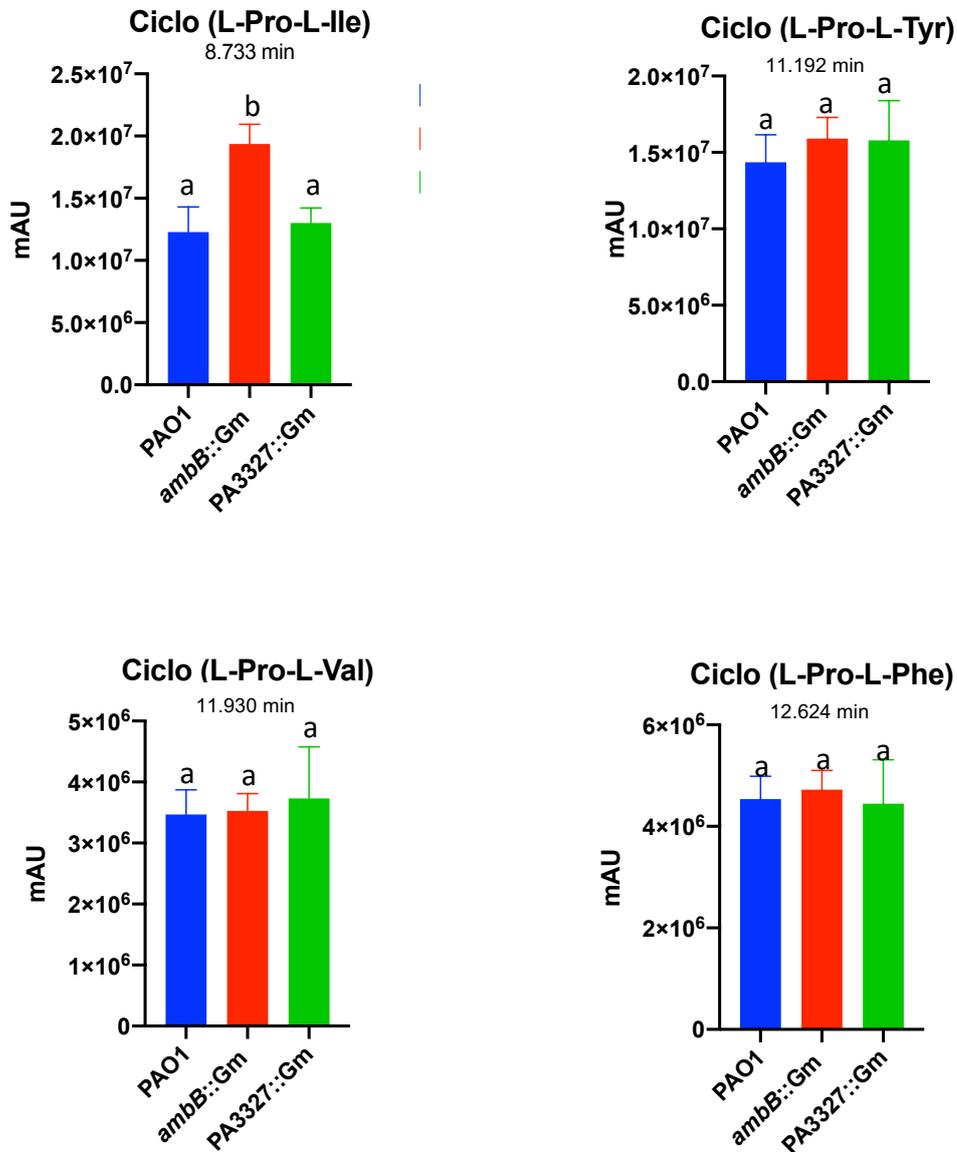


Gráfica 10. Cromatograma obtenido del análisis por HPLC. La línea verde representa la extracción de CDPs de *P. aeruginosa* la cual se tomará como referencia. La línea azul representa la extracción de CDPs de la mutante PA3327::Gm. Las flechas señalan el CDP identificado y el tiempo de retención en minutos.

En ambos cromatogramas se logró observar la presencia de los ciclodipeptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1. Los picos identificados en el cromatograma corresponden a: ciclo(L-Pro-L-Ile) en el tiempo de retención (en minutos) 8.733, el ciclo(L-Pro-L-Tyr) en el tiempo 11.192, ciclo(L-Pro-L-Val) en el tiempo 11.93 y ciclo(L-Pro-L-Phe) en el tiempo 12.624.

Posteriormente se analizó la producción de cada CDP por separado, cuantificando el área relativa bajo el pico. Se empleó como referencia a la cepa PAO1 y se comparó con las dos mutantes de *P. aeruginosa* en *ambB* y PA3327.

Como se muestra a continuación (Gráfica 11), la producción del ciclo(L-Pro-L-Ile) aumentó significativamente en la mutante en *ambB* y se mantuvo igual para la mutante PA3327 respecto a PAO1. La producción del ciclo(L-Pro-L-Tyr) no mostró diferencias significativas entre las mutantes y el grupo control, de la misma manera que tampoco se encontraron diferencias significativas para los CDPs ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) entre las cepas mutantes.

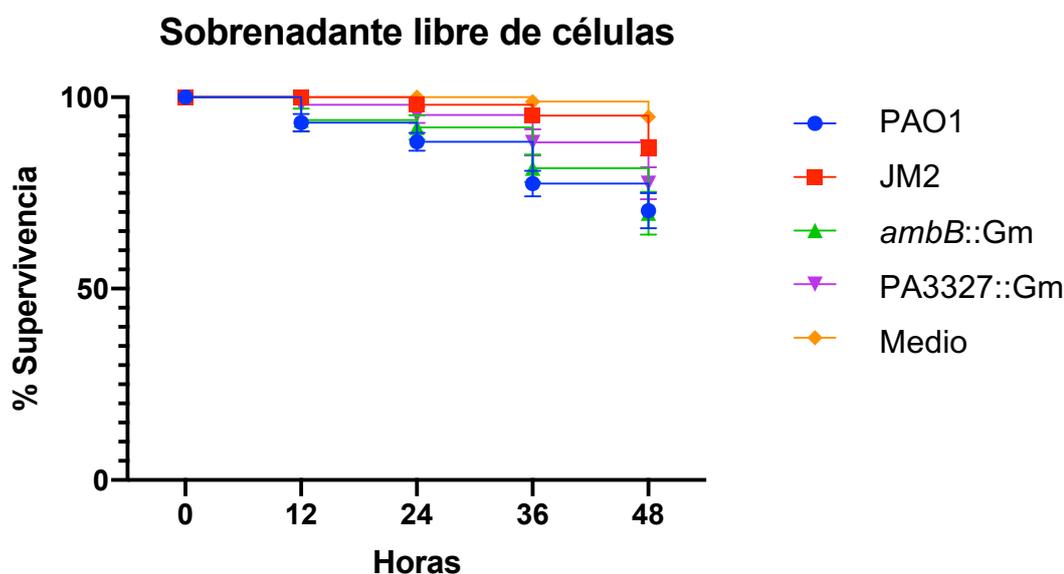


Gráfica 11. Cuantificación de los Ciclo (L-Pro-L-Ile), Ciclo (L-Pro-L-Tyr), Ciclo (L-Pro-L-Val) y Ciclo (L-Pro-L-Phe) (se señala el tiempo de retención bajo el nombre de cada CDP en minutos) en los sobrenadantes de la cepa de referencia PAO1 y en las mutantes en *ambB::Gm* y en *PA3327::Gm*. Las barras representan la media \pm EE de tres experimentos independientes. Se realizó análisis ANOVA de una vía, con prueba post-hoc de Tukey; $n=3$. Las letras minúsculas representan diferencias significativas.

8.5 Efecto de la mutación de NRPS de *P. aeruginosa* sobre el modelo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans es un modelo simple como huésped para el estudio del sistema inmune animal y la patogenicidad causada por microorganismos como bacterias Gram-negativas como *P. aeruginosa*. Existen dos mecanismos de patogenicidad mediante los cuales *P. aeruginosa* pueden matar a *C. elegans*; muerte asociada a toxinas y muerte asociada a la infección.

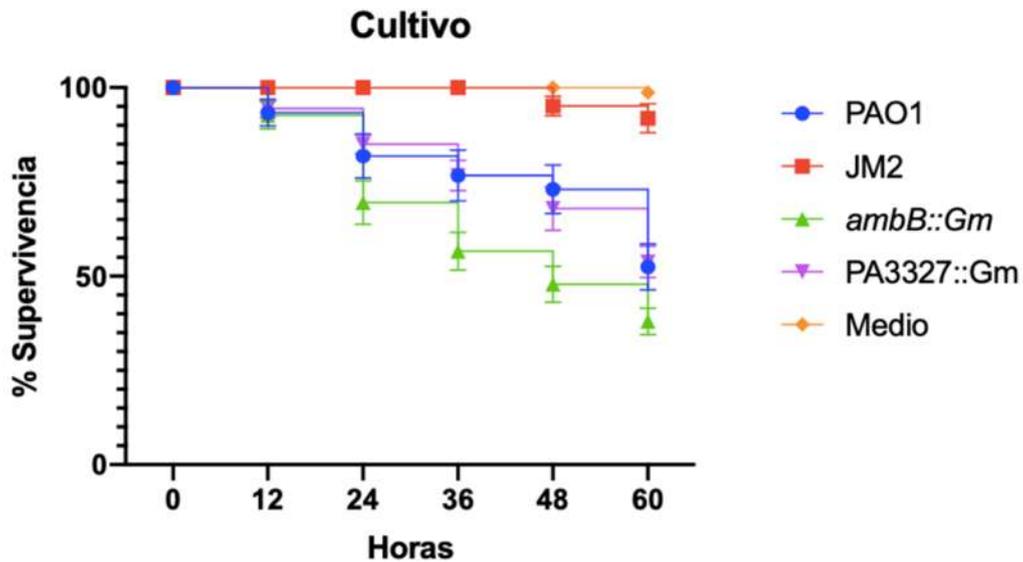
Se estudió la interacción huésped-patógeno entre *C. elegans* y las cepas mutantes en las NRPS *ambB* y PA3327, empleando como cepa control a la cepa silvestre PAO1 y como control de virulencia negativo a la doble mutante JM2 ($\Delta lasI/\Delta RhlI$). Así mismo para analizar estos dos mecanismos de patogenicidad se realizaron ensayos por separado empleando sobrenadantes libres de células de cultivos de 48 horas así como ensayos empleando cultivos de 48 horas.



Gráfica 12. Cuantificación del % de supervivencia de *C. elegans* por la toxicidad de los factores de virulencia secretados en el medio de 48 horas de crecimiento de las diferentes cepas de *P. aeruginosa* PAO1. Los puntos representan la media \pm EE de tres experimentos independientes.

Como se muestra en la Gráfica 12 los sobrenadantes libres de células que disminuyeron mayormente el % de supervivencia de *C. elegans* fueron el de la cepa silvestre PAO1 y la mutante *ambB*::Gm manteniendo un 70% la supervivencia de los nemátodos; mientras que la mutante PA3327::Gm disminuyó solo un 20% la supervivencia a las 48 horas en interacción con el sobrenadante. El sobrenadante de la cepa control JM2 disminuyó el porcentaje de supervivencia

en un 10% a las 48 horas y en el control que solo contenía el medio de cultivo LB la supervivencia solo se redujo un 5%.



Gráfica 13. Cuantificación del % de supervivencia de *C. elegans* por la infección de las distintas cepas de *P. aeruginosa* PAO1 de 48 horas de crecimiento. Los puntos representan la media \pm EE de tres experimentos independientes.

Los resultados en el ensayo de supervivencia de los nemátodos, utilizando los cultivo bacterianos mostrados en la gráfica 13, muestran que la cepa que disminuyó en un mayor porcentaje la supervivencia de los nematodos fue la mutante *ambB::Gm* manteniendo la supervivencia al 40% a las 60 horas. Mientras que con el cultivo de la cepa silvestre PAO1 se mantuvo un 55% de supervivencia de los nemátodos y la cepa mutante PA3327::*Gm*, presentó un efecto similar a la PAO1; como se esperaba, la cepa menos patógena fue la cepa JM2 que solo disminuyó la supervivencia un 10%.

9. DISCUSIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria que pueda causar infecciones graves y potencialmente mortales, principalmente en pacientes con sistemas inmunes debilitados como aquellos con fibrosis quística o afecciones médicas como heridas por diabetes o quemaduras. La virulencia de *P. aeruginosa* es multifactorial y compleja, lo que le permite colonizar una variedad de entornos, incluyendo ambientes hospitalarios y equipos médicos (Gellatly & Hancock, 2013) por lo que es de gran importancia estudiar los mecanismos involucrados en la virulencia de esta bacteria.

Esta bacteria es conocida por su amplio repertorio de factores de virulencia y su capacidad para adaptarse y resistir a los tratamientos antimicrobianos, es conocido que la modulación en la síntesis de estos factores de virulencia es mediada principalmente por un complejo sistema de quorum sensing que involucra moléculas autoinducidas (AI) y sus respectivos reguladores transcripcionales que inducen la biosíntesis de los factores de virulencia (Lee & Zhang, 2015). Las principales moléculas AI empleadas en este sistemas son acil-homoserina-lactonas (AHL) que modulan a los reguladores transcripcionales LasR y RhlR, una tercera señal es una quinolona que interactúa con el regulador transcripcional PqsR (García-Reyes et al., 2020).

Se ha reportado que pequeñas moléculas denominadas ciclodipéptidos (CDPs) pueden modular estos reguladores transcripcionales de tipo LuxR mediante cepas reporteras con el promotor luxCDABE que emite bioluminiscencia en respuesta a AHL, en estos ensayos se demostró que sobrenadantes libres de células que contenían CDPs de bacterias gram-negativas del género *Pseudomonas* logran inducir la bioluminiscencia (Campbell et al., 2009).

Recientemente se reportó el estudio de la relación del grupo hidroxilo de los CDPs ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Hyp-L-Tyr) y ciclo(L-Pro-L-Phe) y su actividad inhibitoria del quorum sensing de *P. aeruginosa* PAO1. Se reportó que el ciclo(L-Pro-L-Phe) que no posee grupos hidroxilo mostró una mayor inhibición en los factores de virulencia de la bacteria, a excepción de la formación de biopelículas, ciclo(L-Pro-L-Phe) también reguló negativamente la expresión de los componentes de QS en *pqsR* y *rhlI*. También se encontró que los CDPs Ciclo(L-Pro-L-Tyr) y ciclo(L-Hyp-L-Tyr) suprimieron genes en los sistemas *las* y *rhl*, demostrando la importancia estructural de los CDPs al interactuar con el QS (L. Li et al., 2023).

En una búsqueda reciente en el genoma de *P. aeruginosa* se identificaron marcos de lectura abiertos que codifican para enzimas péptido sintetasa no ribosomales (NRPS) que se planeó produjeron estos CDPs, donde algunas de estas NRPS estaban involucradas en la síntesis de varios factores de virulencia como los sideróforos pioquelina y pioverdina y al metabolito ácido

L-2-amino-4-metoxi-trans-3-butenoico (AMB), sintetizado por el clúster de genes *ambABCDE*, además de la probable NRPS PA3327 cuya función es desconocida (González et al., 2017). Es por esto que en este trabajo se plantea que las NRPS desempeñan un papel crucial en la virulencia de *P. aeruginosa*.

En el presente estudio se identificaron a los CDPs ciclo(L-Pro-L-Ile), ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) en los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 así como en los de las mutantes en NRPS *ambB::Gm* y *PA3327::Gm*, en cuanto a la mutante *ambB::Gm* en este estudio se observó un aumento significativo en el ciclo(L-Pro-L-Ile) en comparación con la cepa de referencia PAO1, este CDP no había sido cuantificado en el reporte mencionado anteriormente, los demás CDPs no mostraron cambios en su biosíntesis, de manera similar no se encontraron diferencias significativas en los CDPs producidos por la mutante en la NRPs dimodular PA3327.

Previamente se reportó que mutantes por transposición en las NRPS *ambB* y *pvdJ* modificaron de manera positiva la síntesis de los CDPs, ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe), además mutantes dobles en los genes de NRPS *ambB/pvdI* y *pchE/pvdL* disminuyeron la biosíntesis de estos tres CDPs, mientras que algunas otras combinaciones en las mutaciones (*PA3327/pvdI*, *PA3323/pvdL*) aumentaron la biosíntesis de estos como se describe anteriormente (González et al., 2017) (Sólis-Ortiz, Tesis de maestría, 2017).

Dado que *P. aeruginosa* posee varias NRPS (Tabla 1) y las tendencias en la síntesis de CDPs que han sido observadas en este trabajo como en los anteriores mencionados, es posible plantear que en algunas enzimas NRPS en el genoma de esta bacteria, puedan existir módulos redundantes que llevan a cabo la misma función, como la activación de un aminoácido específico, lo que causa que al mutar una NRPS otra pueda sustituir su función. La redundancia genética NRPS podría ser una estrategia competitiva que la bacteria utiliza para aumentar la flexibilidad y diversidad en la síntesis de péptidos no ribosomales y facilitar así la producción de péptidos bioactivos con diversas propiedades biológicas.

Otro escenario que se puede plantear es que sea un caso similar al controversial cuarto sistema de quórum sensing IQS, ya que se planteaba que el grupo de genes *ambABCDE* sintetizaba la señal IQS, posteriormente se aclaró que esta señal es en realidad un carbaldehído, producto de la biosíntesis del factor del sideróforo pioquelina (Cornelis, 2019). Aunque es necesaria más investigación respecto a las NRPS, es posible que además del punto anteriormente planteado, los productos que ensamblan estas enzimas, dejen péptidos o moléculas de “desecho” que la bacteria aprovecha para tener una ventaja competitiva con otras especies como la síntesis de estos CDPs o que puedan ser empleadas en el sistema de QS. El aumento en la biosíntesis de los CDPs puede atribuirse también debido a una mayor biodisponibilidad de aminoácidos debido a la interrupción de la biosíntesis de los péptidos dadas

las NRPS interrumpidas por transposición o con el cassette de gentamicina, nuevamente que estas NRPS no sean específicas para sintetizar a los CDPs. La NRPS PA3327 es dimodular y puede activar a los aminoácidos serina y prolina, siendo este último el aminoácido en común en los diferentes CDPs, una estrategia a abordar podría ser desarrollar una cepa mutante en PA3327 en combinación con otra u otras NRPS que también activen prolina y de esta manera rastrear los CDPs.

Como se ha mencionado anteriormente, la red de QS de *P. aeruginosa* es un sistema complejo que involucra una variedad de moléculas señal que interactúan con reguladores transcripcionales para inducir la biosíntesis de factores de virulencia, bajo el sistema *las* se regula la biosíntesis de enzimas proteolíticas como elastasas y proteasas, bajo el sistema *rhl* se regula la biosíntesis de ramnolípidos y piocianina (Lee & Zhang, 2015), finalmente el sistema PQS regula la formación de biopelículas (Cooke et al., 2020).

Recientemente se reportó que mutaciones simples y dobles en los genes de las NRPS *pvdJ*, *pvdL* y *pvdI* que están involucradas en la biosíntesis del sideróforo pioverdina, resultaron en alteraciones en la conformación de biopelículas de *P. aeruginosa* que además se correlacionó con el contenido de ramnolípidos, así mismo se observaron diferencias en la producción de fenazinas como la piocianina. Este artículo también confirmó que la doble mutante en *pvdJ/pvdL* modificó la biosíntesis del autoinductor del sistema de PQS sugiriendo que los factores de virulencia que se vieron alterados, son resultado de la modificación de este sistema de QS (Díaz-Pérez et al., 2022)

En el presente trabajo se analizaron los factores de virulencia producidos por las cepas mutantes interrumpidas con un cassette de resistencia a gentamicina en genes que codifican para las NRPS *ambB* y PA3327 comparándolos con la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1 y una doble mutante en los sistemas *lasI/rhlI* como control negativo.

Para la cepa *ambB::Gm* los resultados en los factores de virulencia no mostraron diferencias significativas en la cuantificación de elastasa ni proteasas generales así como tampoco en la pioquelina. El único factor de virulencia que disminuyó fue el sideróforo pioverdina y aumentó la producción de biopelículas y correlacionando con este los ramnolípidos y los lipopolisacáridos tuvieron un aumento significativo. Está reportado que la NRPS AmbB en conjunto con la NRPS AmbE sintetizan el metabolito AMB el cual resulta tóxico para plantas y se compone de un residuo de glutamato y dos de residuos de alanina, con los resultados obtenidos se propone que esta molécula además actúe como modulador de la virulencia o compita con el sitio de la quinolona que induce el sistema PQS atenuando o modulando la expresión de los factores de virulencia regulados por este sistema, es necesario continuar investigando a esta NRPS y su versatilidad para sintetizar péptidos que logran interactuar con el QS de *P. aeruginosa* y contribuir a la modulación de la virulencia de la bacteria.

En cuanto a la cepa PA3327::Gm los resultados en los factores de virulencia mostraron un aumento significativo en la cuantificación de la enzima proteolítica elastasa, se observó también una disminución significativa en los factores de virulencia pioverdina y piocianina, así como sorprendentemente un aumento en la biosíntesis de biopelículas y de igual manera que la cepa mutante *ambB*::Gm se mostró una mayor cuantificación de ramnolípidos y lipopolisacáridos. Se desconoce la función de la NRPS PA3327, tiene un tamaño de 2352 aminoácidos, además forma parte de un operón compuesto de 8 genes (PA3327-PA3328-PA3329-PA3330-PA3331-PA3332-fabH2-PA3334) entre los cuales se encuentran deshidrogenasa y monooxigenasas además de proteínas hipotéticas con funciones desconocidas que en conjunto a esta NRPS pueden modificar los aminoácidos que activa esta NRPS hasta formar un péptido específico.

Es importante continuar investigando esta NRPS ya que la evidencia mostrada en este trabajo así como los anteriores descritos señalan que juega un papel en la virulencia de la bacteria *P. aeruginosa*. Se propone que esta NRPS sintetice una molécula que pueda ser empleada como precursor de la piocianina o pioverdina, ya que la síntesis de ambas fue disminuida.

Finalmente, en este trabajo se evaluó la patogenicidad de las cepas de *P. aeruginosa* en el modelo *in vivo* del nematodo *C. elegans*. Para observar la toxicidad por las moléculas secretadas de las cepas mutantes en *ambB*::Gm y PA3327::Gm se realizó un ensayo empleando sobrenadantes libres de células, en este ensayo la cepa que redujo más el porcentaje de la supervivencia de *C. elegans* fue *ambB*::Gm, seguido de *P. aeruginosa* PAO1 y con un efecto similar la cepa PA3327::Gm, en este ensayo se puede observar que los factores de virulencia tóxicos que son expulsados al medio, corresponden con la muerte de los nemátodos, ya que en la cepa *ambB*::Gm se aumentó la producción de piocianina y en PA3327::Gm disminuyó la piocianina, pioverdina y aumentó la elastasa. Este efecto fue levemente marcado en el modelo *in vivo* ya que por lo general se realizan heridas en otros modelos *in vivo* (larvas de *Galleria Mellonella*) para que puedan penetrar los factores de virulencia contenidos en el sobrenadante al interior del organismo como ocurriría en una infección de *P. aeruginosa*.

Adicionalmente se realizó un ensayo empleando los cultivos con las cepas de *P. aeruginosa* que servirán para analizar los factores de virulencia asociados a la bacteria (LPS, biofilm y ramnolípidos) en este ensayo se observó de igual manera que la cepa más virulenta fue la mutante en *ambB*::Gm, consistente con los resultados cuantificados de los factores de virulencia LPS, biopelículas y ramnolípidos que fueron elevado, concluyendo que la mutación en la NRPS causó un aumento en la virulencia de la cepa mutante *ambB*::Gm.

La cepa PA3327::Gm tuvo una virulencia similar a la de la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1, ya que los factores de virulencia secretados piocianina y pioverdina se vieron disminuidos, la cuantificación de elastasa aumentó así como también los factores LPS, biofilm y

ramnolípidos que al tener a la bacteria completa en este ensayo compensó la virulencia de los factores disminuidos con los factores que se vieron aumentados.

El estudio de las NRPS y sus productos es de gran interés para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos contra las infecciones causadas por *P. aeruginosa* ya que al sintetizar péptidos no ribosomales como sideróforos, péptidos antimicrobianos, moléculas de señalización y factores de virulencia estos compuestos bioactivos contribuyen a la capacidad de la bacteria para adquirir nutrientes esenciales, competir con otras bacterias, resistir al sistema inmunitario del hospedador y establecer infecciones persistentes.

10. CONCLUSIÓN

El ORF PA2305/*ambB* que codifica para una NRPS está involucrado en la modulación de la biosíntesis de los factores de virulencia pirocianina, biopelículas, ramnolípidos y lipopolisacáridos en *P. aeruginosa* PAO1. La mutación en *ambB* aumentó el grado de virulencia en el modelo *in vivo* *C. elegans*, correlacionando con la biosíntesis del CDP ciclo(L-Pro-L-Ile).

El ORF PA3327 que codifica para una NRPS modifica la biosíntesis de los factores de virulencia pirocianina y pioverdina, así como en la biosíntesis de biopelículas, ramnolípidos y lipopolisacáridos. Demostrando así que ambas NRPS juegan un papel importante en la virulencia de esta bacteria oportunista.

Referencias

- Abed, R. M. M., Dobretsov, S., Al-Fori, M., Gunasekera, S. P., Sudesh, K., & Paul, V. J. (2013). Quorum-sensing inhibitory compounds from extremophilic microorganisms isolated from a hypersaline cyanobacterial mat. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(7), 759-772. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1276-4>
- Ahator, S. D., & Zhang, L. (2019). 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>
- 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\(95\)00108-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00108-1)
- Alfiniyah, C., Bees, M. A., & Wood, A. J. (2019). *Quorum machinery: Effect of the las system in rhl regulation of P. aeruginosa*. 060001. <https://doi.org/10.1063/1.5139147>
- 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>
- Azimi, S., Klementiev, A. D., Whiteley, M., & Diggle, S. P. (2020). Bacterial Quorum Sensing During Infection. *Annual Review of Microbiology*, 74(1), 201-219. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032020-093845>
- Begg, S. L. (2019). The role of metal ions in the virulence and viability of bacterial pathogens. *Biochemical Society Transactions*, 47(1), 77-87. <https://doi.org/10.1042/BST20180275>
- Blevés, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G. P. F., Filloux, A., & Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology*, 300(8), 534-543. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.005>
- 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>
- Bonneau, A., Roche, B., & Schalk, I. J. (2020). Iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa* by the siderophore pyoverdine: An intricate interacting network including periplasmic and membrane proteins. *Scientific Reports*, 10(1), 120. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56913-x>
- Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G. L. A., & Schalk, I. J. (2009). The *Pseudomonas aeruginosa* Pyochelin-Iron Uptake Pathway and Its Metal Specificity. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3517-3525. <https://doi.org/10.1128/JB.00010-09>
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 77(1), 71-94. <https://doi.org/ale>
- Brimacombe, C. A., Stevens, A., Jun, D., Mercer, R., Lang, A. S., & Beatty, J. T. (2013). Quorum-sensing regulation of a capsular polysaccharide receptor for the *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent (RcGTA). *Molecular Microbiology*, 87(4), 802-817. <https://doi.org/10.1111/mmi.12132>
- Burrows, L. L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: Type IV pili in action. *Annual Review of Microbiology*, 66, 493-520. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150055>
- Campbell, J., Lin, Q., Geske, G. D., & Blackwell, H. E. (2009). New and Unexpected Insights into the Modulation of LuxR-Type Quorum Sensing by Cyclic Dipeptides. *ACS Chemical Biology*, 4(12), 1051-1059. <https://doi.org/10.1021/cb900165y>
- Campos-García, J., Caro, A. D., Nájera, R., Miller-Maier, R. M., Al-Tahhan, R. A., & Soberón-Chávez, G. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG Gene Encodes an NADPH-Dependent β -Ketoacyl Reductase Which Is Specifically Involved in Rhamnolipid Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 180(17), 4442-4451.
- Casadevall, A., & Pirofski, L. (2001). Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(3), 337-344. <https://doi.org/10.1086/322044>
- Coffey, B. M., & Anderson, G. G. (2014). Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1149, 631-641. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0_48
- Colvin, K. M., Alnabelseya, N., Baker, P., Whitney, J. C., Howell, P. L., & Parsek, M. R. (2013). PelA Deacetylase Activity Is Required for Pel Polysaccharide Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 195(10), 2329-2339. <https://doi.org/10.1128/JB.02150-12>
- Cooke, A. C., Florez, C., Dunshee, E. B., Lieber, A. D., Terry, M. L., Light, C. J., & Schertzer, J. W. (2020). *Pseudomonas* Quinolone Signal-Induced Outer Membrane Vesicles Enhance Biofilm

Dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *mSphere*, 5(6), 10.1128/msphere.01109-20. <https://doi.org/10.1128/msphere.01109-20>

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. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00075>

Crousilles, A., Maunders, E., Bartlett, S., Fan, C., Ukor, E.-F., Abdelhamid, Y., Baker, Y., Floto, A., Spring, D. R., & Welch, M. (2015). Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections? *Future Microbiology*, 10(11), 1825-1836. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.100>

Díaz-Pérez, S. P., Solis, C. S., López-Bucio, J. S., Valdez Alarcón, J. J., Villegas, J., Reyes-De la Cruz, H., & Campos-García, J. (2022). Pathogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Biofilm-Associated Is Dependent on the Pyoverdine and Pyocyanin Siderophores by Quorum Sensing Modulation. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02095-5>

Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). (s.f.). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166(1), 30-33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000860>

El Zowalaty, M. E., Al Thani, A. A., Webster, T. J., El Zowalaty, A. E., Schweizer, H. P., Nasrallah, G. K., Marei, H. E., & Ashour, H. M. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: Arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. *Future Microbiology*, 10(10), 1683-1706. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.48>

Engbrecht, J., & Silverman, M. (1984). Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(13), 4154-4158. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.13.4154>

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>

Filloux, A., & Ramos, J.-L. (Eds.). (2014). *Pseudomonas Methods and Protocols* (Vol. 1149). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0473-0>

Florez, C., Raab, J. E., Cooke, A. C., & Schertzer, J. W. (2017). Membrane Distribution of the *Pseudomonas* Quinolone Signal Modulates Outer Membrane Vesicle Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 8(4), e01034-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01034-17>

Galdino, A. C. M., Branquinha, M. H., Santos, A. L. S., & Viganor, L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* and Its Arsenal of Proteases: Weapons to Battle the Host. En S. Chakraborti & N. S. Dhalla (Eds.), *Pathophysiological Aspects of Proteases* (pp. 381-397). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6141-7_16

García, M., Morello, E., Garnier, J., Barrault, C., Garnier, M., Burucoa, C., Lecron, J.-C., Si-Tahar, M., Bernard, F.-X., & Bodet, C. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* flagellum is critical for invasion, cutaneous persistence and induction of inflammatory response of skin epidermis. *Virulence*, 9(1), 1163-1175. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1480830>

García-Reyes, S., Soberón-Chávez, G., & Cocotl-Yanez, M. (2020). The third quorum-sensing system of *Pseudomonas aeruginosa*: *Pseudomonas* quinolone signal and the enigmatic PqsE protein. *Journal of Medical Microbiology*, 69(1), 25-34. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001116>

Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3), 159-173. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12033>

Ghodhbane, H., Elaidi, S., Sabatier, J.-M., Achour, S., Benhmida, J., & Regaya, I. (2015). Bacteriocins active against multi-resistant gram negative bacteria implicated in nosocomial infections. *Infectious Disorders Drug Targets*, 15(1), 2-12. <https://doi.org/10.2174/1871526514666140522113337>

Ghssein, G., & Ezzeddine, Z. (2022). A Review of *Pseudomonas aeruginosa* Metallophores: Pyoverdine, Pyochelin and Pseudopaline. *Biology*, 11(12), 1711. <https://doi.org/10.3390/biology11121711>

Gloag, E. S., German, G. K., Stoodley, P., & Wozniak, D. J. (2018). Viscoelastic properties of *Pseudomonas aeruginosa* variant biofilms. *Scientific Reports*, 8(1), 9691. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28009-5>

Gonçalves, T., & Vasconcelos, U. (2021). Colour Me Blue: The History and the Biotechnological Potential of Pyocyanin. *Molecules*, 26(4), 927. <https://doi.org/10.3390/molecules26040927>

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>

Haiko, J., & Westerlund-Wikström, B. (2013). The Role of the Bacterial Flagellum in Adhesion and Virulence. *Biology*, 2(4), 1242-1267. <https://doi.org/10.3390/biology2041242>

Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A., Forbes, A., Perkins, A., Davey, A., Chess-Williams, R., Kiefel, M., Arora, D., & Grant, G. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), 236. <https://doi.org/10.3390/toxins8080236>

Hauser, A. R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: Infection by injection. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 654-665. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2199>

Hider, R. C., & Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, 27(5), 637. <https://doi.org/10.1039/b906679a>

Horna, G., & Ruiz, J. (2021). Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*, 246, 126719. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126719>

Hunter, R. C., Asfour, F., Dingemans, J., Osuna, B. L., Samad, T., Malfroot, A., Cornelis, P., & Newman, D. K. (2013). Ferrous Iron Is a Significant Component of Bioavailable Iron in Cystic Fibrosis Airways. *mBio*, 4(4), e00557-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00557-13>

Huszczynski, S. M., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2019). The Role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in Bacterial Pathogenesis and Physiology. *Pathogens*, 9(1), 6. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010006>

Hwang, S., Lee, N., Cho, S., Palsson, B., & Cho, B.-K. (2020). Repurposing Modular Polyketide Synthases and Non-ribosomal Peptide Synthetases for Novel Chemical Biosynthesis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 87. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00087>

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). <https://doi.org/10.1007/BF00140108>

Izoré, T., & Cryle, M. J. (2018). The many faces and important roles of protein–protein interactions during non-ribosomal peptide synthesis. *Natural Product Reports*, 35(11), 1120-1139. <https://doi.org/10.1039/C8NP00038G>

Jaremko, M. J., Davis, T. D., Corpuz, J. C., & Burkart, M. D. (2020). Type II non-ribosomal peptide synthetase proteins: Structure, mechanism, and protein–protein interactions. *Natural Product Reports*, 37(3), 355-379. <https://doi.org/10.1039/C9NP00047J>

Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., & Dharmaraj, S. (2014). Pyocyanin: Production, applications, challenges and new insights. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(4), 1159-1168. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1552-5>

Juhas, M., Crook, D. W., & Hood, D. W. (2008). Type IV secretion systems: Tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cellular Microbiology*, 10(12), 2377-2386. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01187.x>

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)

Kumar, S. N., Mohandas, C., Nambisan, B., Sreerag, R. S., & Jayaprakas, C. A. (2014). Cyclo(L-Pro-D-Arg): A new antibacterial and antitumour diketopiperazine from *Bacillus cereus* associated with a rhabditid entomopathogenic. *Folia Microbiologica*, 59(3), 197-202. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0282-2>

Laarman, A. J., Bardoel, B. W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F. J., van Strijp, J. A. G., & Rooijackers, S. H. M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Alkaline Protease Blocks Complement Activation via the Classical and Lectin Pathways. *The Journal of Immunology*, 188(1), 386-393. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102162>

Langan, K. M., Kotsimbos, T., & Peleg, A. Y. (2015). Managing *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections in cystic fibrosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 28(6), 547-556. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000217>

Latifi, A., Fogliano, 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). 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>

Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H., & Kong, F. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in Molecular Medicine*, *10*(12), 599-606. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.10.002>

Lautru, S., Gondry, M., Genet, R., & Pernodet, J.-L. (2002). The Albonoursin Gene Cluster of *S. noursei*. *Chemistry & Biology*, *9*(12), 1355-1364. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00285-5](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00285-5)

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>

Li, X.-H., & Lee, J.-H. (2019). Quorum sensing-dependent post-secretional activation of extracellular proteases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(51), 19635-19644. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011047>

Ma, L., Conover, M., Lu, H., Parsek, M. R., Bayles, K., & Wozniak, D. J. (2009). Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. *PLOS Pathogens*, *5*(3), e1000354. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354>

Marahiel, M. A. (2009). Working outside the protein-synthesis rules: Insights into non-ribosomal peptide synthesis: INSIGHTS INTO NON-RIBOSOMAL PEPTIDE SYNTHESIS. *Journal of Peptide Science*, *15*(12), 799-807. <https://doi.org/10.1002/psc.1183>

Marahiel, M. A., & Essen, L. -O. (2009). Chapter 13 Nonribosomal Peptide Synthetases. En *Methods in Enzymology* (Vol. 458, pp. 337-351). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04813-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04813-7)

Martin, L. W., Robson, C. L., Watts, A. M., Gray, A. R., Wainwright, C. E., Bell, S. C., Ramsay, K. A., Kidd, T. J., Reid, D. W., Brockway, B., & Lamont, I. L. (2018). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* Antibiotic Resistance Genes Varies Greatly during Infections in Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *62*(11), e01789-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01789-18>

McErlean, M., Overbay, J., & Van Lanen, S. (2019). Refining and expanding nonribosomal peptide synthetase function and mechanism. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *46*(3-4), 493-513. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-02130-w>

Meng, X., Ahator, S. D., & Zhang, L.-H. (2020). Molecular Mechanisms of Phosphate Stress Activation of *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems. *mSphere*, *5*(2), e00119-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00119-20>

Meuskens, I., Saragliadis, A., Leo, J. C., & Linke, D. (2019). Type V Secretion Systems: An Overview of Passenger Domain Functions. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 1163. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01163>

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>

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, *79*(3), 629-661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

Nickzad, A., & Déziel, E. (2014). The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development—An approach for control? *Letters in Applied Microbiology*, *58*(5), 447-453. <https://doi.org/10.1111/lam.12211>

Novick, R. P., & Geisinger, E. (2008). Quorum Sensing in Staphylococci. *Annual Review of Genetics*, *42*(1), 541-564. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091640>

Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Martínez-Trujillo, M., del Río, R. E., Campos-García, J., & López-Bucio, J. (2011). Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(17), 7253-7258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006740108>

Pena, R. T., Blasco, L., Ambroa, A., González-Pedrajo, B., Fernández-García, L., López, M., Bleriot, I., Bou, G., García-Contreras, R., Wood, T. K., & Tomás, M. (2019). Relationship Between

Quorum Sensing and Secretion Systems. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1100. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01100>

Prasad, C. (1995). Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides*, 16(1), 151-164. [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(94\)00017-Z](https://doi.org/10.1016/0196-9781(94)00017-Z)

Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>

Rojas Murcia, N., Lee, X., Waridel, P., Maspoli, A., Imker, H. J., Chai, T., Walsh, C. T., & Reimann, C. (2015). The *Pseudomonas aeruginosa* antimetabolite L -2-amino-4-methoxy-trans-3-butenoic acid (AMB) is made from glutamate and two alanine residues via a thiotemplate-linked tripeptide precursor. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00170>

Ronnebaum, T. A., & Lamb, A. L. (2018). Nonribosomal peptides for iron acquisition: Pyochelin biosynthesis as a case study. *Current Opinion in Structural Biology*, 53, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.01.015>

Ryder, C., Byrd, M., & Wozniak, D. J. (2007). Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology*, 10(6), 644-648. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.010>

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>

Scopel, M., Abraham, W.-R., Henriques, A. T., & Macedo, A. J. (2013). Dipeptide cis-cyclo(Leucyl-Tyrosyl) produced by sponge associated *Penicillium* sp. F37 inhibits biofilm formation of the pathogenic *Staphylococcus epidermidis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(3), 624-626. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.020>

Sharma, A. K., Dhasmana, N., Dubey, N., Kumar, N., Gangwal, A., Gupta, M., & Singh, Y. (2017). Bacterial Virulence Factors: Secreted for Survival. *Indian Journal of Microbiology*, 57(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0625-1>

Soberón-Chávez, G., González-Valdez, A., Soto-Aceves, M. P., & Cocotl-Yañez, M. (2021). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas*: From molecular genetics to the market. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 136-146. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13700>

Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(6), 718-725. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0150-3>

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). *PAO1, an opportunistic pathogen*. 406, 6.

Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A., & Schnürer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4322-4327. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4322-4327.2002>

Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>

Visca, P., Imperi, F., & Lamont, I. L. (2007). Pyoverdine siderophores: From biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology*, 15(1), 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.004>

Wagener, B. M., Anjum, N., Christiaans, S. C., Banks, M. E., Parker, J. C., Threet, A. T., Walker, R. R., Isbell, K. D., Moser, S. A., Stevens, T., Alexeyev, M. F., Audia, J. P., Richter, W., Hardy, K. S., Saleh, L. A., Morgan, C., & Pittet, J.-F. (2020). Exoenzyme Y Contributes to End-Organ Dysfunction Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in Critically Ill Patients: An Exploratory Study. *Toxins*, 12(6), 369. <https://doi.org/10.3390/toxins12060369>

Wang, S., Yu, S., Zhang, Z., Wei, Q., Yan, L., Ai, G., Liu, H., & Ma, L. Z. (2014). Coordination of Swarming Motility, Biosurfactant Synthesis, and Biofilm Matrix Exopolysaccharide Production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(21), 6724-6732. <https://doi.org/10.1128/AEM.01237-14>

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>

Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319-346.

<https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001>

Whiteley, M., Diggle, S. P., & Greenberg, E. P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature*, *551*(7680), 313-320. <https://doi.org/10.1038/nature24624>

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 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)

Ye, L., Cornelis, P., Guillemin, K., Ballet, S., & Hammerich, O. (2014). Structure revision of N-mercapto-4-formylcarbostyryl produced by *Pseudomonas fluorescens* G308 to 2-(2-hydroxyphenyl)thiazole-4-carbaldehyde [aeruginaldehyde]. *Natural Product Communications*, *9*(6), 789-794.

Zhao, K., Li, W., Li, J., Ma, T., Wang, K., Yuan, Y., Li, J. S., Xie, R., Huang, T., Zhang, Y., Zhou, Y., Huang, N., Wu, W., Wang, Z., Zhang, J., Yue, B., Zhou, Z., Li, J., Wei, Y.-Q., ... Zhou, X. (2019). TesG is a type I secretion effector of *Pseudomonas aeruginosa* that suppresses the host immune response during chronic infection. *Nature Microbiology*, *4*(3), 459-469. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0322-4>

Zulianello, L., Canard, C., Köhler, T., Caille, D., Lacroix, J.-S., & Meda, P. (2006). Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, *74*(6), 3134-3147. <https://doi.org/10.1128/IAI.01772-05>