



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
OPCIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TÍTULO:

“ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE LA VÍA TOR/S6K DE *Arabidopsis thaliana*
POR CICLODIPÉPTIDOS PRODUCIDOS POR *Pseudomonas aeruginosa*”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTADO POR:

M.C. OMAR GONZÁLEZ LÓPEZ

ASESOR:

D.C. HOMERO REYES DE LA CRUZ

CO-ASESOR:

D.C. JESÚS CAMPOS GARCÍA

MORELIA, MICHOACÁN, MARZO DE 2021

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al CONACyT por el apoyo económico recibido.
- A mi asesor el DC Homero Reyes de la Cruz por recibirme en su laboratorio y apoyarme en la realización de mi proyecto de tesis. Además, por aconsejarme, transmitirme sus conocimientos y siempre estar disponible para ayudarme.
- A mi co-asesor el DC Jesús Campos García por todas las enseñanzas y consejos.
- A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas, que siempre hicieron ameno el trabajo en el laboratorio.
- A mi familia que siempre me han apoyado y alentado en mis propósitos y metas.
- Especialmente a Gaby, mi compañera de vida, que me alentó a alcanzar este paso en mi formación. Su cariño y compañía han sido determinantes para continuar a pesar de los problemas y adversidades.

DEDICATORIA

A mi familia,
gracias a su cariño y apoyo,
hacen de mí una mejor persona.
Este logro es por y para ellos.
Especialmente esta dedicado a Gaby,
que me es mi complemento y guía.
Mientras estes a mi lado podremos
superar cualquier adversidad.

ÍNDICE

	Pag
Índice de figuras.....	6
Índice de tablas.....	7
A. Resumen.....	8
B. Summary.....	9
I. Introducción.....	10
II. Marco teórico.....	12
1. La rizósfera.....	12
1.1. Interacciones entre organismos.....	12
2. Quórum sensing.....	14
2.1. Quórum sensing en bacterias Gram negativas.....	15
2.1.1. Autoinductores en bacterias Gram negativas.....	17
2.1.1.1. Acil-homoserina lactonas.....	17
2.1.1.2. Autoinductor-2.....	18
2.1.1.3. Bradioxetina.....	18
2.1.1.4. DSF.....	18
2.1.1.5. Ciclodipéptidos.....	19
2.1.1.5.1. Peptido sintetas no ribosomales.....	20
2.1.1.5.2. Ciclodipéptido sintetas.....	22
2.1.1.5.3. Comparación en las enzimas que sintetizan CDPs.....	24
2.2. Quórum sensing en bacterias Gram positivas.....	25
3. Generalidades de <i>P. aeruginosa</i>	27
3.1. Regulación del quórum sensing en <i>P. aeruginosa</i>	28
3.1.1. Regulación del quórum sensing por los sistemas <i>las</i> , <i>rhl</i> y <i>pqs</i>	29
3.1.2. Señal IQS.....	33
3.1.3. Factor de señal difusible.....	33
3.1.4. Sistema de señalización mediado por poliaminas.....	34

3.1.5. Ácido fenilacético.....	34
3.1.6. CDPs en <i>P. aeruginosa</i>	35
3.2. Regulación del quórum sensing sobre otras sistemas regulatorios.....	36
4. Vía de TOR.....	39
4.1. Vía de TOR en plantas.....	44
III. Justificación.....	49
IV. Hipótesis.....	50
V. Objetivos.....	51
VI. Resultados.....	52
Capítulo 1.....	53
Capítulo 2.....	62
Capítulo 3.....	79
Capítulo 4.....	93
Capítulo 5.....	97
VII. Discusión de resultados.....	101
VII. Conclusion.....	106
IX. Referencias bibliográficas.....	107

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
Fig 1. Interacción entre plantas, patógenos, bacterias promotoras del crecimiento y suelo.....	13
Fig 2. Representación esquemática de la regulación de genes por quórum sensing.....	15
Fig 3. Típico sistema de quórum sensing tipo LuxIR de bacterias Gram negativas.....	16
Fig 4. Síntesis de ciclodipéptidos por el operón de aureusimina en <i>Staphylococcus aureus</i>	21
Fig 5. Mecanismo catalítico propuesto para la formación de ciclo(L-Phe-L-Leu) por AlbC de <i>Streptomyces noursei</i>	24
Fig 6. Típico sistema de dos componentes del sistema de quórum sensing de bacterias Gram positivas.....	26
Fig 7. Algunos oligopéptidos autoinductores del quórum sensing de bacterias Gram positivas.....	27
Fig 8. Sistema de comunicación por quórum sensing de <i>P. aeruginosa</i> ...	32
Fig 9. Interconexión del sistema de quórum sensing con otras redes regulatorias en <i>P. aeruginosa</i>	36
Fig 10. Estructura de TOR y sus complejos.....	41
Fig 11. Vía de señalización de TOR en mamíferos.....	43
Fig 12. Vía de señalización de TOR en plantas.....	47
Fig 13. Comparación entre los dominios de S6K de humanos y <i>A. thaliana</i>	48

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Algunas moléculas autoinductoras identificadas en bacterias Gram negativas.....	17
Tabla 2. Estructuras de señales químicas y sus derivados producidos por <i>P. aeruginosa</i>	30

A. RESUMEN

Los ciclodipéptidos (CDPs) son las moléculas de origen peptídico más pequeñas que pueden ser producidas por diversos organismos como bacterias, hongos y animales. Han sido estudiados por sus diferentes propiedades biológicas como antibacterianos, antifúngicos, antivirales, anticancerígenos, entre otros. En el presente trabajo, examinamos la capacidad de los CDPs producidos por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* de activar la vía de señalización de TOR (blanco de la Rapamicina, por sus siglas en inglés) y regular la arquitectura de la raíz en *Arabidopsis thaliana*. Esta bacteria es conocida como patógeno oportunista de humanos y patógeno de plantas. *P. aeruginosa* produce cuatro ciclodipéptidos bioactivos: ciclo(L-Pro-L-Leu), ciclo(L-Pro-L-Phe), ciclo(L-Pro-L-Tyr), and ciclo(L-Pro-L-Val). Estas moléculas fueron capaces de modular los programas celulares básicos no sólo por la activación de la vía auxínica, sino por la promoción de la fosforilación de la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K), un sustrato río abajo de la cinasa TOR. La inoculación de plantas de *Arabidopsis thaliana* con *P. aeruginosa* PAO1 (WT) ó JM2 (cepa no patógena $\Delta lasI/\Delta rhII$) o por la exposición de plantas a la mezcla de CDPs, estimuló el crecimiento de la raíz primaria y promovió el incremento de raíces laterales por un incremento en la proliferación celular. Mientras que con el uso de plantas de líneas afectadas en la expresión de TOR se indicó el papel determinante de esta vía en la fitoestimulación.

Palabras clave: ciclodipéptidos; promoción del crecimiento; interacción planta-bacteria; vía TOR; fitoestimulación.

B. Summary

Cyclodipeptides (CDPs) are the smallest molecules of peptide origin that can be produced by several organisms such as bacteria, fungi and animals. These molecules have been studied due to their different biological properties such as antibacterial, antifungal, antiviral, anticancer, among others. In the present work, we examine the ability of CDPs produced by the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* to activate the TOR signaling pathway (Rapamycin target) and regulate root architecture in *Arabidopsis thaliana*. This bacterium is known as an opportunistic human pathogen and a plant pathogen. *P. aeruginosa* produces four bioactive cyclodipeptides: cycle (L-Pro-L-Leu), cycle (L-Pro-L-Phe), cycle (L-Pro-L-Tyr), and cycle (L-Pro-L-Val). These molecules were able to modulate basic cellular programs not only by activating the auxinic pathway, but by promoting the ribosomal protein kinase S6 (S6K) phosphorylation, a downstream substrate of TOR kinase. The inoculation of *Arabidopsis thaliana* plants with *P. aeruginosa* PAO1 (WT) or JM2 (a non-pathogenic strain $\Delta lasI/\Delta rhII$) or by the exposure of plants to the CDPs mixture, stimulated the primary root growth and promoted the growth of lateral roots by an increasing cell proliferation. Moreover, the use of plants lines affected in TOR expression, the determining role of this pathway in phytostimulation was indicated.

I. INTRODUCCIÓN

La bacteria Gram negativa con forma de bacilo *Pseudomonas aeruginosa*, ha sido ampliamente estudiada y es conocida como un patógeno oportunista en humanos y patógeno de plantas, es ubicua en la naturaleza, pero se puede localizar en la rizósfera, donde prolifera alimentándose de los exudados radiculares y otros nutrientes del suelo (Plotnikova et al., 2000; Rahme et al., 1995). Esta bacteria puede evadir las defensas del hospedero a través de la producción de diversos factores de virulencia, como son: toxinas, adhesinas, pirocianina, ciclodipéptidos (CDPs) y otros (Dela Ahator y Zhang, 2019). Los CDPs son moléculas cicladas de tamaño pequeño, que están compuestas de dos aminoácidos enlazados por enlaces peptídicos. Estos compuestos pueden ser sintetizados por una gran variedad de microorganismos como bacterias, hongos y animales (Canu et al., 2018; Mishra et al., 2017). Los ciclodipéptidos tienen la capacidad de modular las interacciones de quórum sensing y comunicación cruzada entre especies de organismos evolucionariamente distantes como bacterias y plantas (González and Keshavan, 2006; Ortiz-Castro et al., 2011). Se ha reportado que *P. aeruginosa* produce los ciclodipéptidos ciclo(L-Pro-L-Leu), ciclo(L-Pro-L-Phe), ciclo(L-Pro-L-Tyr) y ciclo(L-Pro-L-Val), que promueven el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, mediante un mecanismo que parece sustituir a las auxinas en la unión con su receptor y son capaces de activar los genes de respuesta a auxinas (González et al., 2017; Ortiz-Castro et al., 2011).

El crecimiento y desarrollo de las plantas requieren la activación de la vía de TOR (blanco de la Rapamicina, por sus siglas en inglés), que es el regulador maestro del crecimiento en eucariontes (Rexin et al., 2015). La vía de TOR desempeña un papel central en la percepción de estímulos intra y extracelulares como factores de crecimiento, nutrientes, niveles de energía y el daño celular, a través de la integración de estos estímulos, la activación de TOR regula una variedad de procesos celulares esenciales como el metabolismo, el ciclo celular, la autofagia y

la síntesis de proteínas, mediante la fosforilación de diferentes proteínas blanco (Deprost et al., 2007; Dobrenel et al., 2016; Rexin et al., 2015). La proteína cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K) es uno de los blancos de TOR más ampliamente estudiados, debido a que la activación de S6K induce un incremento en la síntesis de proteínas (Fenton y Gout, 2011; Van Dam et al., 2011). Previamente nuestro grupo de trabajo reportó que los CDPs producidos por *P. aeruginosa* activaron a la proteína S6K en plantas de maíz (*ZmS6K*), como se mencionó es un blanco de TOR, por lo que podríamos decir que la vía de TOR puede ser activada por los CDPs (Corona-Sánchez et al., 2019). Si tomamos en cuenta que la vía de TOR se encuentra conservada entre maíz y *Arabidopsis*, entonces podríamos hipotetizar que los CDPs también pueden activar la vía de TOR en *A. thaliana*. En el presente trabajo determinamos que la promoción del crecimiento durante la interacción *Arabidopsis-Pseudomonas* requiere la activación de la proteína S6K de *A. thaliana* (*AtS6K*) y que los CDPs producidos por *P. aeruginosa* fueron responsables de dicha activación. Además, determinamos que los CDPs indujeron un aumento de la proliferación celular del meristemo de la raíz primaria y la maduración de primordios de raíces laterales, indicando que los ciclodipéptidos estimulan la proliferación celular en plantas de *A. thaliana* mediante un mecanismo dependiente de la activación de la vía de TOR.

II. MARCO TEÓRICO

1. La rizósfera

La rizósfera se refiere a la zona del suelo que se encuentra directamente influenciada por las secreciones o exudados de las raíces de las plantas. Estos exudados constituyen una variedad de moléculas liberadas por las raíces como son ácidos orgánicos, azúcares, polisacaridos y otros, que pueden ser utilizados como nutrientes por otros organismos como hongos, bacterias, protistas, nematodos e invertebrados. Entonces, la rizósfera se considera como una zona densamente poblada. Esta población puede ser modificada por la secreción de metabolitos primarios (por ejemplo, ácidos orgánicos, carbohidratos y aminoácidos) y secundarios (por ejemplo, alcaloides, terpenoides y fenoles) de las raíces que ayudan a la atracción de organismos benéficos y a combatir patógenos. El proceso de exudación está altamente regulado ya que la síntesis de metabolitos representa un proceso altamente costoso, hablando en términos energéticos, por el consumo de carbono y nitrógeno de la planta (Venturi y Keel, 2016).

1.1. Interacciones entre microorganismos

La rizósfera sirve como huésped de inmensa diversidad de microorganismos que pueden establecer diferentes interacciones como comensales, mutualistas y parasíticas o también llamadas positivas o benéficas, negativas o patogénicas y neutras (Fig 1) (Venturi y Keel, 2016). En el caso de las bacterias benéficas, también llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR), colonizan competitivamente las raíces de las plantas, estimulan el crecimiento y pueden mostrar una actividad de biocontrol hacia organismos patógenos que causan enfermedades de plantas. Para llevar a cabo dichos procesos, lo realizan a través de varios mecanismos como la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de fosfato y otras sales, la producción de hormonas y la liberación de antibióticos y/o toxinas (Haas y Défago, 2005; Venturi y Keel, 2016; Vishwakarma et al., 2020).

Algunas PGPR se denominan como biopesticidas por su propiedad biocontrol sobresaliente. Estas PGPR pertenecen principalmente a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* (Haas y Défago, 2005). Al conjunto de organismos benéficos que colonizan la rizósfera se le conoce como microbiota de la rizósfera o rizomicrobioma. Esta colonización de la rizósfera, está regulada directamente por la composición de los exudados radicales y esta composición se determina por los eventos de comunicación llevados a cabo entre los microorganismos, tanto benéficos y patogénicos, y las raíces de las plantas (Venturi y Keel, 2016; Vishwakarma et al., 2020). La comunicación entre microorganismos y plantas es llevada a cabo mediante moléculas señal. En bacterias, este mecanismo de comunicación mediante moléculas señal se denomina "quórum sensing" (Venturi y Keel, 2016).

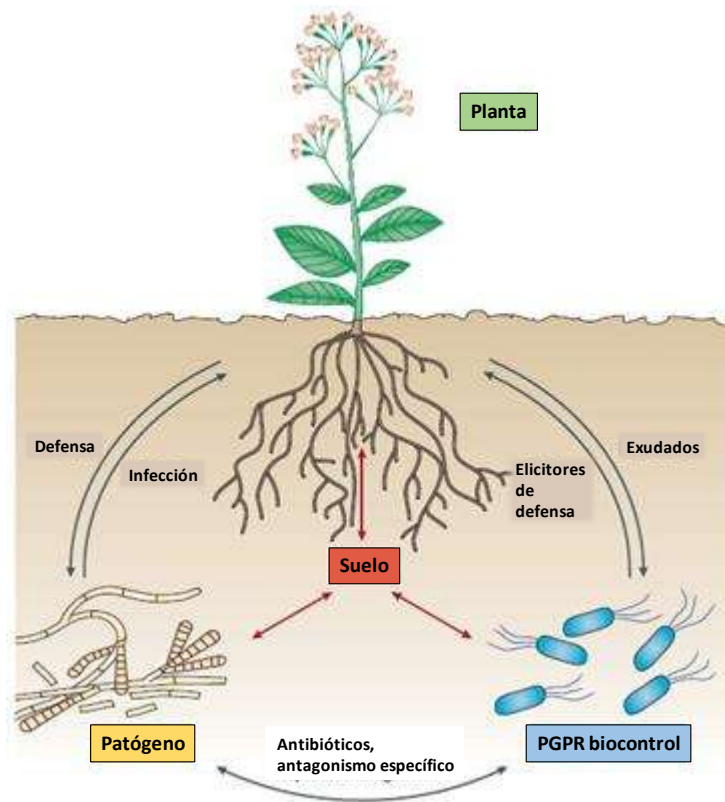


Fig 1. Interacción entre planta, patógenos, bacterias promotoras del crecimiento y suelo (tomada de Haas y Défago, 2005).

2. Quórum sensing

Por mucho tiempo se pensó que las bacterias trabajaban como organismos individuales diseñados para proliferar bajo diversas condiciones, pero incapaces de interactuar con otros individuos y responder colectivamente a estímulos ambientales, que es un comportamiento típico de organismos pluricelulares (Juhas, et al., 2005). Posteriormente se descubrió que la percepción de estímulos ambientales se lleva a cabo de manera sincronizada a partir de la densidad de la población, como fue observado con el fenómeno de bioluminiscencia en la bacteria Gram negativa *Vibrio fischeri* o la regulación de la competencia genética en la bacteria Gram positiva *Streptococcus pneumoniae* (Gonzalez y Keshavan, 2006). Ambos fenómenos que parecen tan diferentes y aislados, son controlados por lo que se conoce como “quórum sensing” o “percepción del quórum” (QS). Se denomina QS al proceso de comunicación célula a célula en el cual las bacterias usan la producción y posterior detección de señales químicas extracelulares llamadas autoinductores, esta señal difunde al medio circundante (Reading y Sperandio, 2006). Entonces, a medida que incrementa la población se van acumulando las señales hasta que se llega al umbral de concentración, una vez que se excede un umbral de concentración, esto lleva a la activación de vías de señalización que, a su vez, activaran la expresión de genes relacionados a la regulación de una población (Fig 2) (Gonzalez y Keshavan, 2006; Juhas et al., 2005).

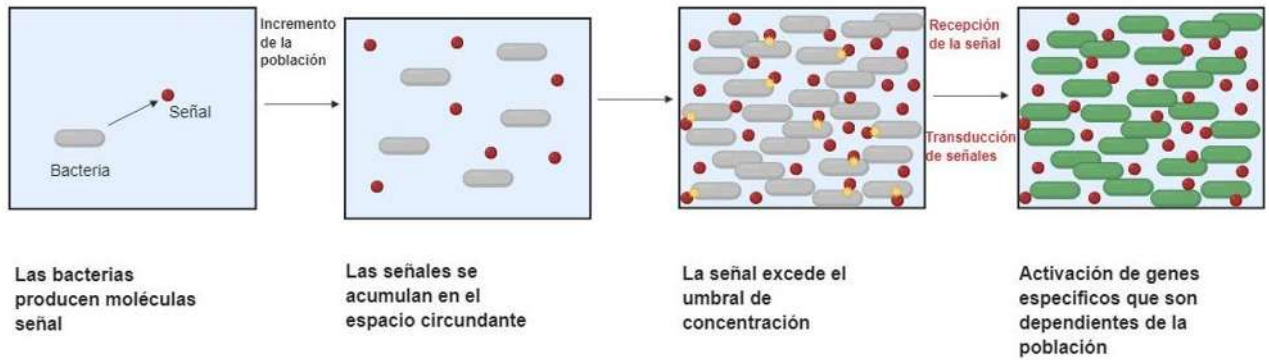


Fig 2. Representación esquemática de la regulación de genes por quórum sensing (modificado de Pérez-Velázquez et al., 2016).

Las bacterias usan la señalización por quórum sensing para regular una variedad de fenómenos, como la producción de exopolisacáridos, la producción de factores de virulencia y la motilidad, las cuales son esenciales para el establecimiento exitoso de una relación simbiótica o patógena con su respectivo huésped (Gonzalez y Keshavan, 2006).

2.1. Quórum sensing en bacterias Gram negativas

El QS fue descubierto en la bacteria luminiscente marina *Vibrio fischeri*, que es un simbiote facultativo de peces marinos y calamares. La bacteria vive en los órganos de luz de estos animales marinos y es responsable de la producción de luminiscencia, lo cual se cree que ayuda a los animales a escapar de depredadores y en la comunicación. Interesantemente, la bioluminiscencia solo se presenta cuando existe la interacción simbiótica entre la bacteria y el órgano del pez y no cuando está en el estado de vida libre (Hastings y Nealson, 1977). Esta regulación de la bioluminiscencia está mediada por el sistema LuxI-LuxR (ó LuxIR), que pertenece a la red de señalización de quórum sensing (Fig 3). Este sistema funciona cuando la proteína, LuxI, sintetiza en el citoplasma la señal química que es una acil-homoserina lactona (HSL) de seis carbonos, 3-oxo-hexanoil-HSL, la cual difunde a través de la membrana plasmática hacia el medio circundante y, a medida que las

HSL se acumulan llevan a la unión y activación de su regulador específico LuxR. Cuando LuxR es activado, actúa como factor transcripcional, de manera que se une a secuencias palindrómicas específicas del ADN, llamadas “caja lux”, favoreciendo el reclutamiento de la ARN polimerasa, y así activando la expresión de genes específicos (Gonzalez y Keshavan, 2006; Ng y Bassler, 2009).

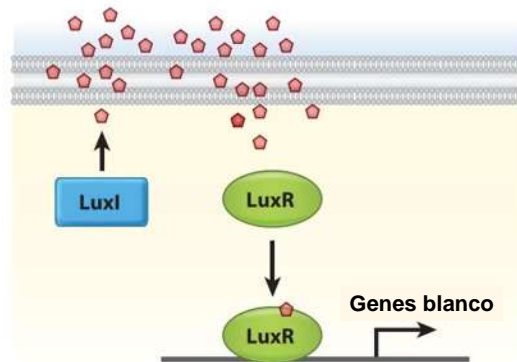
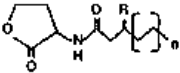
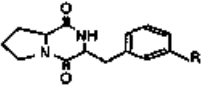
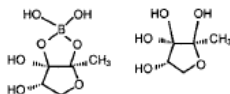
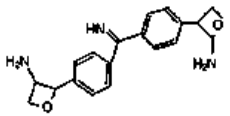
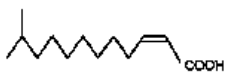


Fig 3. Típico sistema de quórum sensing tipo LuxIR de bacterias Gram negativas. Cuando LuxI sintetiza HSL (pentágonos rojos) difunde al medio, cuando se alcanza la concentración necesaria la señal activa a LuxR que actúa como regulador transcripcional para la activación de genes blanco (tomada de Ng y Bassler, 2009).

La gran mayoría de sistemas de QS en bacterias Gram negativas que han sido estudiadas utilizan HSL como moléculas señalizadoras (de Kievit e Iglewski, 2000). Además de las HSL, se sabe que existen otros tipos de señales autoinductoras, cuyas estructuras son químicamente diferentes y cada una de ellas forman parte de una red regulatoria diversa, como el autoinductor-2, los ciclodipéptidos, y otros (Tabla 1) (Gonzalez y Keshavan, 2006; Atkinson y Williams, 2009).

Tabla 1. Algunas moléculas autoinducoras identificadas en bacterias Gram negativas (tomada de Gonzalez y Keshavan, 2006).

Autoinductores	Estructura general	Especies productoras	Fenotipo(s) regulados
HSL		Gran diversidad bacterias gram-negativas	Motilidad, exopolisacáridos, otros
ciclo(L-Phe-L-Pro), ciclo(L-Tyr-L-Pro)		<i>P. fluorescens</i> , <i>P. alkaligenes</i>	Cepas indicadoras de activación cruzada de quorum-sensing
AI-2		<i>V. harvei</i> , <i>S. entérica</i> serovar Tiphymurium	Bioluminiscencia, transportadores ABC
Bradioxetina		<i>B. japonicum</i>	Nodulación
DSF		<i>X. campestris</i>	Producción endoglucanasa

2.1.1. Autoinductores de bacterias Gram negativas

2.1.1.1. Acil-homoserina lactonas

Las HSL son el grupo de autoinductores más ampliamente estudiado y su actividad se ha relacionado principalmente en la regulación de la patogenicidad. Están compuestos de un anillo de homoserina lactona y un grupo acilo de longitud variable, siendo la cadena más corta de 4 carbonos y 18 la cadena más larga. Además de la longitud, pueden variar en su estructura por el nivel de saturación y por la presencia de un grupo oxo o hidroxilo en el carbono 3 de la cadena acilo. Esto provee variación y especificidad a la comunicación de quórum sensing, ya que

determinadas bacterias solo pueden producir ciertos tipos de HSL (Debunne et al., 2017; Gonzalez y Keshavan, 2006).

2.1.1.2. Autoinductor-2

El autoinductor-2 (AI-2), se ha descrito como una molécula señal para la comunicación interespecies, ya que puede ser producida por bacterias Gram positivas y negativas. Esta molécula se descubrió en *Vibrio harveyi*, identificada como una furanosil borato diéster donde es responsable de la regulación de la bioluminiscencia. La molécula AI-2 aislada de *Salmonella enterica* serotovar Typhimurium es una (2*R*,4*S*)-2-metil-2,3,3,4-hidroxitetrahidrofurano que carece de Boro. Ambas bacterias reconocen estas dos formas de AI-2, que derivan del precursor dihidroxil-2,3-pentanodiona. La señalización de AI-2 se ha relacionado con la regulación de la secreción tipo 3 en *E. coli* O15:H7, el factor de virulencia VirB en *Shigella flexner* y alrededor de 400 genes mediante un microarreglo en cepas de *E. coli* (Debunne et al., 2017; Gonzalez y Keshavan, 2006).

2.1.1.3. Bradioxetina

La estructura de la bradioxetina, 2-{4- [[4-(3-aminooxetan-2- il) fenil] (imino) metil] fenil} oxetan-3-il amina es similar al sideróforo ácido mugeneico y parece que la bradioxetina es regulada por las concentraciones de hierro del medio. Esta molécula se ha relacionado con la regulación de los genes *nod* en *Bradyrhizobium japonicum*, una bacteria simbiote fijadora de nitrógeno en muchas plantas leguminosas. Dichos genes *nod* son reprimidos a altas densidades poblacionales (Gonzalez y Keshavan, 2006).

2.1.1.4. DSF

El factor de señal difusible, ácido *cis*-11-metil-dodecanoico (DSF), es una molécula compuesta de un esqueleto de ácido graso insaturado. Es otra señal de comunicación célula a célula que está ampliamente conservada en diversas

especies bacterianas. Está se considera como una molécula de señalización inter e intraespecie y se le ha implicado en la regulación de la producción de factores de virulencia y biofilm. El sistema de quórum sensing dependiente de DSF fue identificado en *Xantomonas campestris* pv. *campestris* y consta de RpfF, requerido para la síntesis de DSF, y un sistema regulatorio de dos componentes, la cinasa sensora RpfC y su regulador de respuesta RpfG (Dela Ahator y Zhang, 2019; Gonzalez y Keshavan, 2006).

2.1.1.5. Ciclodipéptidos

Los ciclodipéptidos (2,5-dioxopiperazinas, 2,5-dicetopiperazinas o dipéptidos anhídridos) y sus derivados las dicetopiperazinas (DKPs), son los compuestos peptídicos más pequeños, los cuales constituyen una gran clase de metabolitos secundarios metabolizados por diversos microorganismos como bacterias, hongos e incluso mamíferos (Belin et al., 2012; Nilov et al., 2018; Prasad 1995). Desde el primer reporte, en 1924, han sido descubiertos un gran número de ciclodipéptidos bioactivos y recientemente han cobrado cierto interés debido a la diversidad de actividades biológicas que muestran, como son antibacterial, antifúngica, antiviral, antitumoral, inmunosupresoras y antiinflamatorias (de Carvalho y Abraham, 2012; Wang et al., 2017).

El papel biológico de los CDPs en los organismos que los producen permanece aún poco claro. Se cree que algunos ciclodipéptidos pueden actuar como pequeñas moléculas difusibles involucradas en la comunicación célula-célula. Estos parecen constituir una nueva clase de señales de quórum sensing bacteriano o entre especies bacterianas (González et al., 2017; Martínez-Carranza et al., 2018). Debido a los efectos en plantas y cultivos celulares humanos, incluso se considera un nuevo mecanismo de comunicación entre reinos (Hernández-Padilla et al., 2017; Ortiz-Castro et al., 2011).

Los ciclodipéptidos, como su nombre lo indica, están constituidos de dos aminoácidos enlazados de manera cíclica por dos enlaces peptídicos, lo que genera un anillo central diceto y los grupos sustituyentes orientados hacia extremos opuestos (Prasad, 1995). Por lo que se pueden obtener combinaciones de los 20 aminoácidos esenciales, además de aminoácidos no esenciales.

Como se mencionó anteriormente, los CDPs pueden ser sintetizados por diversos organismos. Dicha síntesis se puede realizar enzimáticamente mediante dos mecanismos. El primer mecanismo, y el primeramente descubierto, se lleva a cabo por la acción de las péptido sintetetasas no ribosomales (NRPS) y el segundo mecanismo es realizado por las ciclodipéptido sintetasas (CDPS).

2.1.1.5.1. Péptido sintetetasas no ribosomales.

Las NRPS son las enzimas responsables de la síntesis de muchos productos naturales usados en la industria farmacológica, incluyendo antibióticos (por ej. vancomicina, penicilina), compuestos anticancerígenos (por ej. bleomicina, epotilona) e inmunosupresores (ciclosporina) (Wyatt et al., 2012). Las NRPS son enzimas grandes, multimodulares involucradas en la síntesis de muchos péptidos no ribosomales. Cada módulo es responsable de la incorporación de un aminoácido y está constituido generalmente por tres dominios: adenilación (A), tiolación (T) y condensación (C) (Fig 4) (Grünwald y Marahiel, 2006).

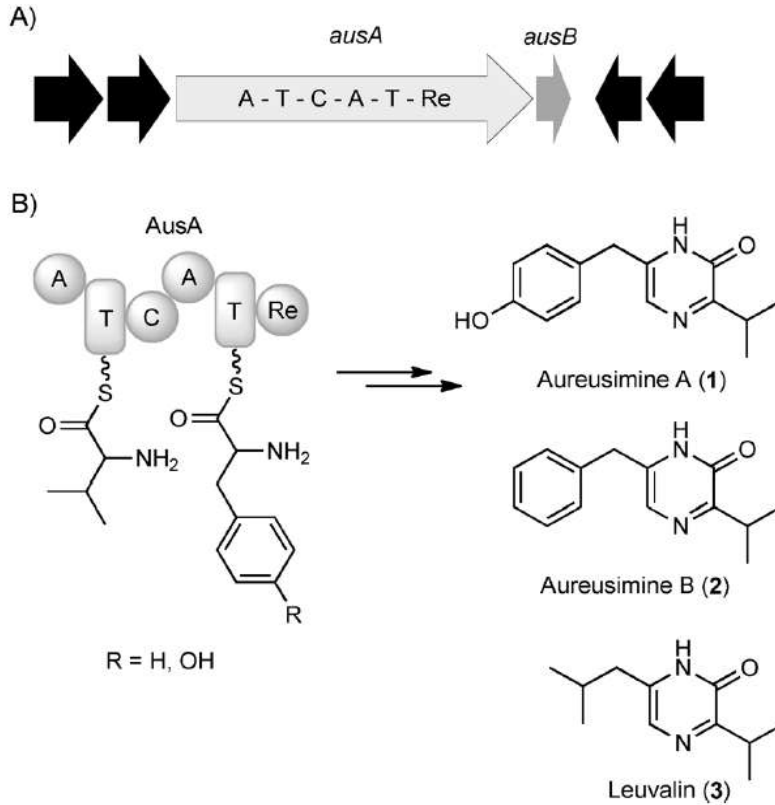


Fig 4. Síntesis de ciclodipéptidos por el operón de aureusimina en *Staphylococcus aureus*. A) El operón está conformado por los genes *ausA*, que codifica para una péptido sintetasa no ribosomal y *ausB*, que codifica para una fosfopantetenil transferasa. B) Esquema de los dominios de AusA para la síntesis de péptidos no ribosomales. Para el ensamble de los ciclodipéptidos consta de dos modulos conformados por los dominios de adenilación (A), tiolación (T), condensación (C) y reductasa (Re). De la actividad de AusA se obtienen tres productos: aureusimina A (1), aureusimina B (2) y leuvalina (3) (tomada de Wyatt et al., 2012).

El dominio A (~550 aminoácidos) controla el primer paso de la síntesis enzimática, que es el reconocimiento y activación del aminoácido. Este dominio cataliza dos reacciones. Primero, selecciona el aminoácido de la poza disponible de sustratos, seguido de la activación como un aminoacil adenilado. El segundo paso, el aminoacil adenilado activado es transferido al grupo tiol del cofactor 4-fosfopanteína (ppan) del dominio T, el cual es el único dominio de las NRPS sin una actividad catalítica. El dominio T (~80 aminoácidos) facilita el transporte ordenado de

sustratos y productos intermedios de elongación a los centros catalíticos (Grünewald y Marahiel, 2006).

La formación del enlace peptídico es mediada por el dominio C (~450 aminoácidos). Este dominio cataliza el ataque nucleofílico entre el grupo amino del aminoácido unido al dominio T río abajo con el tioéster electrofílico del aminoácido o péptido unido al dominio T río arriba. La direccionalidad de esta reacción está dada por un sitio donador y un sitio aceptor para electrófilos y nucleófilos, respectivamente. De acuerdo a este mecanismo el sitio aceptor une al nucleófilo con gran afinidad hasta que la entrada del electrófilo completa el proceso de condensación (Grünewald y Marahiel, 2006).

2.1.1.5.2. Ciclodipéptido sintasas.

En 2002, fue descubierto que para la formación de la albonoursina (ciclo(α,β -deshidroPhe- α,β -deshidroLeu ó c Δ F Δ L) producida por *Streptomyces noursei* se requiere de AlbC, una enzima pequeña (239 residuos) que fue caracterizada como una CDPS y cuya actividad cataliza la formación del ciclodipéptido ciclo(L-Phe-L-Leu), que es el precursor de la albonoursina (Gondry et al. 2009). Esta enzima mostró no estar relacionada estructural ni funcionalmente con las enzimas NRPS anteriormente descritas, cuya acción cataliza la formación de péptidos no ribosomales (Gondry et al. 2009; Watanabe et al. 2007).

Las CDPS utilizan aminoacil-ARNt como sustratos para la formación de diferentes ciclodipéptidos y no son dependientes de ATP para la formación del enlace peptídico (Canu et al., 2019; Gondry et al., 2009). Desde la primera descripción de la proteína AlbC, ha aumentado considerablemente el número de enzimas identificadas con la actividad de sintetizar ciclodipéptidos, más 120 miembros hasta mediados de 2019 (Canu et al., 2019; Gondry et al., 2018; Jacques et al., 2015).

Las CDPS usan dos aminoacil-ARNt como sustratos en un mecanismo secuencial tipo “ping-pong” para formar los dos enlaces peptídicos del ciclo dipéptido (Moutiez et al., 2014). Este mecanismo fue caracterizado en AlbC para la formación de ciclo(L-Phe-L-Leu) (Fig 5). Donde la unión del primer aminoacil-ARNt se lleva por el enlace covalente del aminoácido al residuo S37, generando un intermediario acil-enzima. El segundo aminoacil-ARNt se une al intermediario acil-enzima para formar un intermediario dipeptidil-enzima (Moutiez et al., 2014). Y finalmente, se lleva a cabo la ciclación intramolecular, donde el residuo T202 sirve como un donador de protones y así generando el ciclodipéptido. Además de los residuos mencionados, que interactúan directamente, también los residuos Y178 y E182 participan en el anclaje y estabilización de los aminoácidos a la enzima (Canu et al., 2019; Moutiez et al., 2014). Estos cuatro residuos S37, T202, Y178 y E182, se han encontrado conservados en todas las CDPS (Canu et al., 2019). Como estos residuos adoptan posiciones similares en las estructuras de otras CDPS, podemos pensar que todas las CDPS comparten el mismo mecanismo catalítico (Bourgeois et al., 2020; Canu et al., 2019).

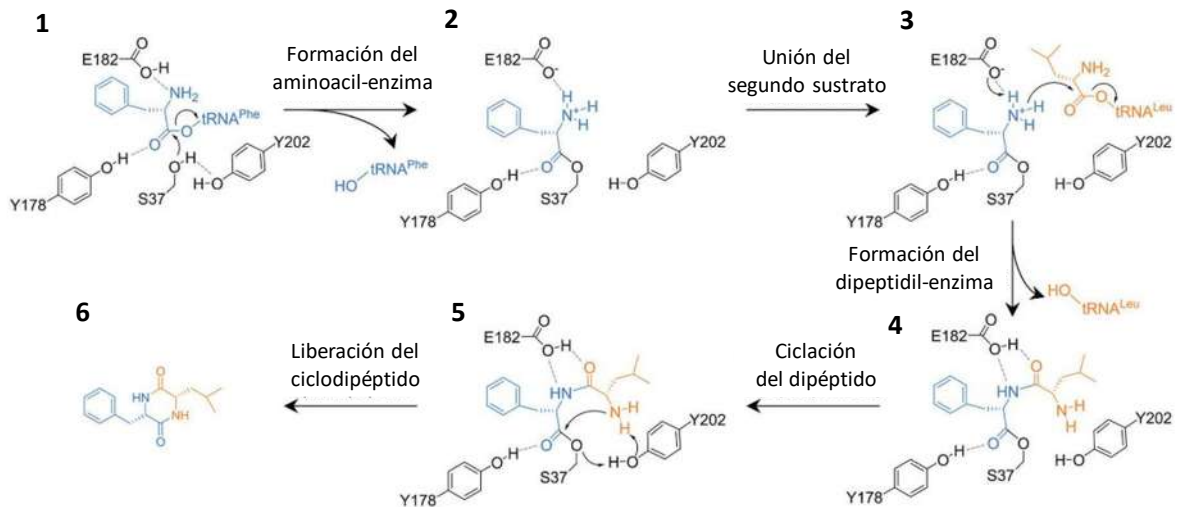


Fig 5. Mecanismo catalítico propuesto para la formación de ciclo(L-Phe-L-Leu) por AlbC de *Streptomyces noursei*. 1) Incorporación y estabilización del primer Phe-ARnt (color azul). 2) Formación de un intermediario acil-enzima. 3) Interacción del segundo Leu-ARnt (color rojo) con el acil-enzima y ataque del grupo amino de la primer Phe al ester carbonilo del segundo Leu-ARnt. 4) Formación del intermediario dipéptido-enzima. 5) Reacción de ciclación del dipéptido. 6) Liberación de la enzima para formar ciclo(L-Phe-L-Leu) (modificada de Canu et al., 2019)

Una característica estructural importante de las enzimas CDPS es el alto grado de similitud estructural con los dominios catalíticos de las aminoacil-ARNt sintetasas de clase Ic, como TyrRS y TrpRS, sugiriendo que las CDPS pudieran derivar de un precursor común. Las CDPS constan de dos bolsillos, P1 y P2, localizados cercanos uno del otro. El bolsillo P1 es estructuralmente similar al bolsillo de TyrRS y TrpRS en cuanto a la unión del aminoacil, mientras que el bolsillo P2 no es equivalente a esta clase de enzimas e interactúa con el segundo aminoacil (Gondry et al., 2009; Moutiez et al., 2014).

2.1.1.5.3. Comparación de las enzimas que sintetizan CDPs.

Los sistemas enzimáticos de NRPS y CDPS producen DKPs en la naturaleza. Las CDPS son proteínas pequeñas (alrededor de 26 kDa), mientras que las NRPS son sistemas multimodulares y multienzimáticos grandes, de alrededor de diez veces

mayor tamaño comparado con las CDPS. La gran diferencia en tamaño se debe a las estrategias que utilizan para la activación de los aminoácidos: 1) las NRPS utilizan a los dominios de adenilación y tiolación para reconocer y activar a los aminoácidos, además de requerir del empleo de ATP; y 2) las CDPS utilizan aminoacil-ARNt con lo que no requiere la activación del aminoácido. Por lo tanto, las CDPS están restringidas a los aminoácidos canónicos enlazados a los ARNt mientras que el rango de sustratos que pueden ser usados por las NRPS es muy amplio, debido a que los sustratos pueden estar modificados previo o posterior a la síntesis enzimática y una variedad de orígenes, además de aminoácidos pueden emplear ácidos grasos, anillos hidrocarbonados, azúcares, etc.

En cuanto a su distribución en la naturaleza, es interesante que las NRPS se encuentran en ampliamente distribuidas en bacterias y hongos, pero no se han encontrado en animales, y las CDPS han sido identificadas en bacterias, hongos, protozoarios y animales.

Algo más a resaltar es que de las DKPs obtenidas a partir de CDPS solamente se tienen hipótesis acerca de su función, mientras que para las NRPS generalmente se le ha asignado una función (sideróforos, toxinas, etc.).

2.2. Quórum sensing en bacterias Gram positivas

Las bacterias Gram positivas utilizan principalmente oligopéptidos modificados como autoinductores para la regulación de genes por quórum sensing. A diferencia de las HSL que difunden a través de la membrana, los péptidos son impermeables a las membranas biológicas. Por lo que para su secreción requieren de transportadores especializados donde, generalmente, el proceso de transporte está asociado a modificaciones como la ciclación del péptido. Una vez liberada la señal, está se acumula y a medida que incrementa la población también incrementa la concentración de autoinductores, hasta que se rebasa el umbral de concentración y es percibida la señal por un receptor membranal, que típicamente son receptores

tipo histidina cinasa, por lo que son llamados proteínas señales de dos componentes. Una vez que es percibida la señal está es transducida por varios eventos de fosforilación, hasta que es activado el regulador citoplásmico que también funciona como regulador transcripcional que activa la expresión de genes blanco (Fig 6) (Ng y Bassler, 2009).

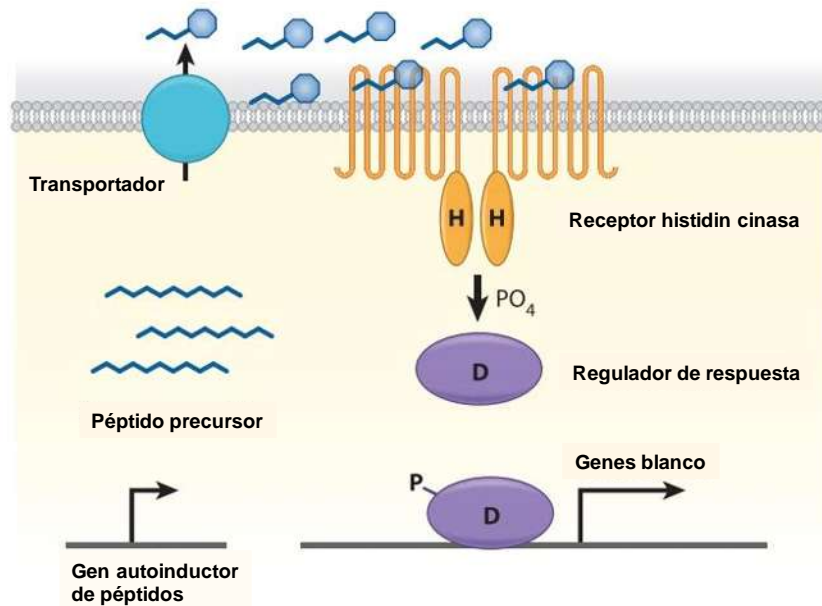


Fig 6. Típico sistema de dos componentes del sistema de quórum sensing de bacterias Gram positivas (tomado de Ng y Bassler, 2009).

Los péptidos autoinductores están codificados genéticamente, por lo que cada especie bacteriana puede producir péptidos con una secuencia específica y única (Fig 7), a diferencia de las HSL producidas por bacterias gram negativas que parten de una molécula nuclear y sólo hay modificaciones de la misma molécula.

ADPITRQWGD

B. subtilis (ComX)

ERGMT

B. subtilis (CSF)

EMRLSKFFRDFILQRKK

S. pneumoniae (CSP)

S. aureus (AgrD)

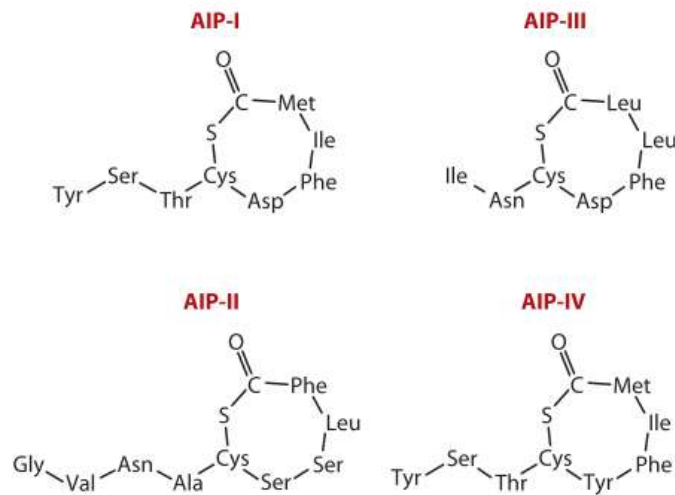


Fig 7. Algunos oligopéptidos autoinductores del quórum sensing de bacterias Gram positivas. En la parte superior se muestran las secuencias de aminoácidos de los péptidos autoinductores ComX y CSF de *Bacillus subtilis* y CSP de *Streptococcus pneumoniae*. En la parte inferior se muestran los cuatro péptidos autoinductores producidos por *Staphylococcus aureus* (tomada de Ng y Bassler, 2009).

3. Generalidades de *P. aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa con forma de bastón, con metabolismo aeróbico, que mide alrededor de 0.5-0.8 μm de ancho y 1.5-3.0 μm de largo, casi todas las cepas son móviles debido a un único flagelo polar, pertenece a la clase de las Gamma Proteobacterias. Es capaz de crecer en condiciones atmosféricas adversas, por lo que ha colonizado una gran cantidad de nichos ecológicos, así su hábitat está ampliamente distribuido, considerándose como una bacteria ubicua por su capacidad de colonizar suelos, aguas y otros ambientes

naturales y artificiales (Jayaseelan et al., 2013). El género *Pseudomonas* fue incluido en la familia *Pseudomonadaceae*. Otros miembros del género incluyen *P. alcaligenes*, *P. anguilliseptica*, *P. citronellolis*, *P. flavescens*, *P. jinjuensis*, *P. mendocina*, *P. nitroreducens*, *P. oleovorans*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. resinovorans* y *P. straminae*, entre otros.

En cuanto a la importancia clínica de *P. aeruginosa*, se refiere como un patógeno oportunista, que se encuentra entre las principales causantes de infecciones oportunistas en humanos, afectando a víctimas de quemaduras, infecciones del tracto urinario de pacientes cateterizados y neumonía en pacientes intrahospitalarios. También es una causa predominante de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística. Estas infecciones son difíciles de erradicar debido a la resistencia natural de la bacteria a los antibióticos comúnmente usados (Karatuna y Yagci, 2010; Stover et al., 2000). *P. aeruginosa* es capaz de causar infecciones en diversas especies, además de mamíferos, como insectos, nematodos y plantas (Walker et al., 2004). Esta capacidad de invasión se puede atribuir a la capacidad de producir una amplia variedad de factores de virulencia (como toxinas, adhesinas, pirocianina, ciclodipéptidos, entre otros) y mecanismos de defensa (como bombas de expulsión, formación de biofilm, entre otros) (Dela Ahator y Zhang, 2019; Walker et al., 2004).

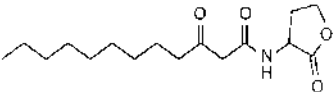
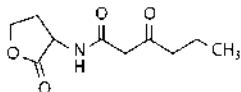
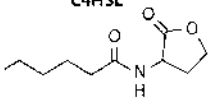
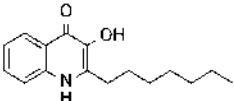
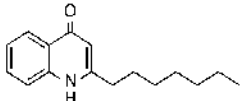
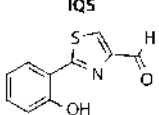
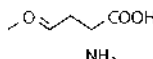
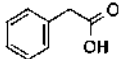
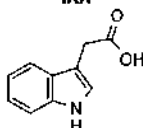
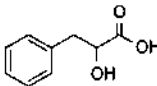

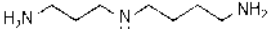
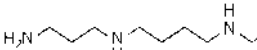


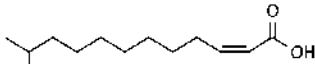

3.1. Regulación de quórum sensing en *P. aeruginosa*

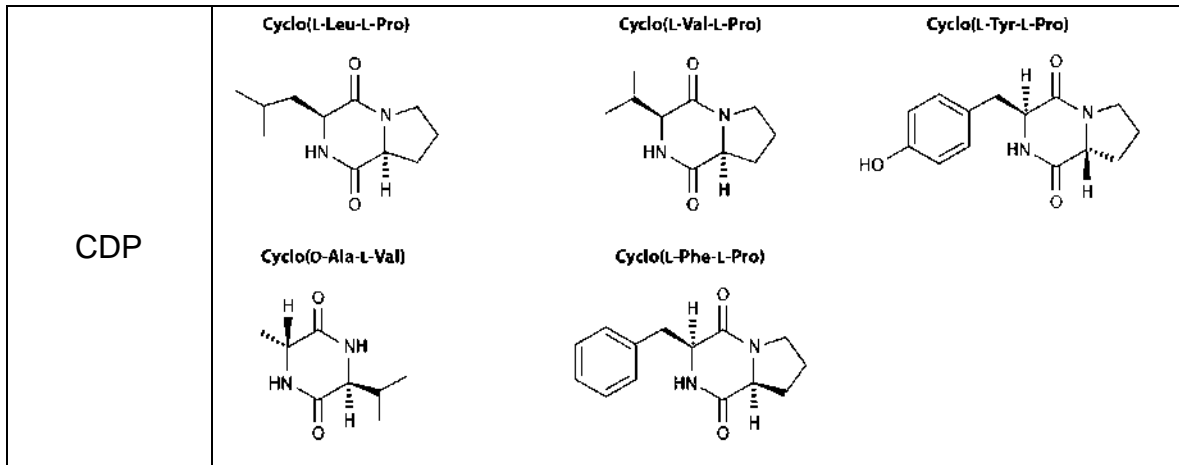
Uno de los sistemas de comunicación célula a célula más estudiados es el de *P. aeruginosa*. En este organismo, al igual que otros patógenos, se descubrió que el circuito de QS regula la expresión de factores de virulencia, así como la formación de biofilm y se ha especulado que la actividad patógena y la regulación por QS están estrechamente ligadas, siendo un determinante para el establecimiento efectivo de la infección (de Kievit e Iglewski, 2000; Juhas et al., 2005).

3.1.1. Regulación del quórum sensing por los sistemas *las*, *rhl* y *pqs*.

En *P. aeruginosa*, operan dos sistemas principales de QS íntimamente ligados. Estos son el sistema *las*, que consiste del activador transcripcional, LasR y de la sintetasa de HSL, LasI (Tabla 2), esta última cataliza la síntesis de *N*-3-oxododecanoil-homoserina lactona (3OC12HSL); y el sistema *rhl*, que consiste del regulador transcripcional, RhIR y de la sintetasa de HSL, RhII (Tabla 2), esta última cataliza la síntesis de *N*-butanoil-homoserina lactona (C4HSL) (Dela Ahator y Zhang, 2019; Juhas et al., 2005; Schuster y Greenberg, 2006) (Fig 8). Los sistemas *las* y *rhl* son homólogos al sistema LuxIR de *V. fischeri*, por lo que el modelo de señalización por quórum sensing funciona de una manera similar, inicia con el autoinductor (3OC12HSL ó C4HSL) que es producido a niveles basales a bajas densidades celulares. Entonces conforme aumenta la densidad celular, también incrementa la concentración del autoinductor hasta que es alcanzado un umbral de concentración. A esta concentración, el autoinductor se une a su proteína blanco específica (LasR ó RhIR) y así la activa, lo que conduce a la expresión de diversos genes, entre los que incluyen las sintetasas de HSL (LasI y RhII), creandose un circuito de retroalimentación o autoinducción. Estos sistemas están arreglados de manera jerárquica donde el sistema *las* activa al sistema *rhl*, esto resulta en un empalme en su regulón que ejerce un control trascricional en la expresión de factores de virulencia como elastasa, proteasa alcalina, la proteasa LasA, exotoxina A, ramnolípidos, cianuro de hidrogeno, lecitinas citotoxinas y la motilidad bacteriana (Pearson et al., 1997; Dela Ahator y Zhang, 2019).

Tabla 2. Estructuras de señales químicas y sus derivados producidos por *P. aeruginosa*.

Molécula	Estructura
HSL	<p>3OC12HSL </p> <p>3OC6HSL </p> <p>C4HSL </p>
Quinolonas	<p>PQS </p> <p>HHQ </p>
IQS	<p>IQS </p> <p>AMB </p>
PAA	<p>PAA </p> <p>IAA </p> <p>3-Phenylactic acid </p>
Poliaminas	<p>Putrescine </p> <p>SPD </p> <p>SPM </p>
DFS	<p>CDA </p> <p>BDSF </p> <p>DSF </p> <p>CDSF </p>



Existe un tercer sistema de regulación de QS en *P. aeruginosa*, es llevado a cabo por señales de quinolonas, químicamente caracterizado como 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS) (Tabla 2). El grupo de genes *pqsABCD* está involucrado en la producción del precursor de PQS, 2-heptil-4(1H)-quinolona (HHQ), el cual es convertido a PQS por PqsH. La producción de PQS es regulada por el regulador PqsR (también nombrada MvfR) y este sistema de quórum sensing controla la síntesis de ciertos factores de virulencia como piocianina, ramnolípidos, elastasa, lecitinas y afecta el desarrollo de biofilm (Dela Ahator y Zhang, 2019). El sistema *pqs* provee un enlace entre los sistemas *las* y *rhl*. La transcripción de genes requerida para la síntesis de PQS es regulado positivamente por LasR pero está bajo control negativo del sistema *rhl*. Por lo que la producción de PQS está directamente relacionado a las concentraciones de 3OC12HSL y C4HSL, sugiriendo un delicado balance entre los dos sistemas (Dela Ahator y Zhang, 2019; Juhas et al., 2005).

3.1.2. Señal IQS

También se ha identificado otro sistema de QS en *P. aeruginosa*, el cual es controlado por la señal química 2-(2-hidroxipentil)-tiazol-4-carbaldehído (IQS) (Tabla 2), cuya síntesis es regulada por el grupo de genes *ambBCDE*. Este sistema fue identificado bajo condiciones limitantes de fosfato, donde regula a los sistemas *pqs* y *rhl*, y además se determinó que este sistema es independiente de LasR y dependiente de PhoB, que es un regulador de respuesta a fosfato (Fig 8). Aunque aún se requiere mucha información sobre este mecanismo y su papel en la regulación del quórum sensing, por ejemplo, no se ha determinado el receptor de IQS y el papel del antimetabolito ácido L-2-amino-4-metoxi-*trans*-3-butenoico (AMB) que es sintetizado por las enzimas AmbCDBA (Dela Ahator y Zhang, 2019).

3.1.3. Factor de señal difusible

P. aeruginosa produce un análogo de DSF, ácido *cis*-2-decenoico (CDA) (Tabla 2), que requiere de *Dspl*, considerado el homólogo de PpfF y se cree que la percepción de la señal es realizada por PA4982, que tiene un 32% de similitud con RpfC. En esta bacteria, la mutación de *dspI* abole la producción de CDA y afecta la regulación de determinantes de virulencia como pioverdina y piocianina, la motilidad formación de biofilm y tolerancia a antibióticos (Dela Ahator y Zhang, 2019; Gonzalez y Keshavan, 2006). Además de responder a CDA, *P. aeruginosa* puede responder a DSF y BDSF (de *Burkholderia cenocepacia*) para la regulación de la virulencia, formación de biofilm, tolerancia al estrés y resistencia a poliximinas. Por el contrario, CDA no puede ser percibido por *B. cenocepacia* ni por *X. campestris*, por lo que *P. aeruginosa* puede co-habitar con estas bacterias en infecciones de pulmón y plantas, respectivamente. CDA y sus derivados modulan la formación de biofilm y motilidad en otras bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus pyogenes*, y *Bacillus subtilis*. Aún no

se ha determinado si el sistema de regulación por CDA cruza con otros mecanismos de quórum sensing (Dela Ahator y Zhang, 2019).

3.1.4. Sistema de señalización mediado por poliaminas

Se conocen como poliaminas a un grupo de policationes orgánicos lineares de bajo peso molecular. En bacterias, la biosíntesis de poliaminas involucra una serie de descarboxilasas que utilizan como sustrato a los aminoácidos arginina, ornitina y lisina. *P. aeruginosa* produce principalmente tres poliaminas, que son putresina, espermidina y cadaverina (Tabla 2). Cuando se mutaron los genes del transportador de espermidina, SpuDEFGH, se interrumpió la inducción de los genes del sistema de secreción tipo III (T3SS). En *P. aeruginosa*, T3SS desempeña un papel importante en la infección al inyectar proteínas efectoras para la supresión de la respuesta inmune del hospedero y facilitar las infecciones sistémicas. Las poliaminas y sus precursores también participan en la modulación de procesos como la respuesta al estrés, tolerancia ácida y resistencia antimicrobiana (Dela Ahator y Zhang, 2019).

3.1.5. Ácido fenilacético

P. aeruginosa cuenta con múltiples sistemas regulatorios que le permiten adaptarse a diferentes condiciones y lograr una infección efectiva. Como se mencionó arriba en el texto, T3SS es un importante marcador de la respuesta patógena de la bacteria. En este sentido, se identificó que derivados del triptófano como los es el ácido 3-indolacético (AIA) inhibió la señal T3SS. Más tarde, se identificó que *P. aeruginosa* produce durante la fase estacionaria otro derivado del triptófano denominado ácido fenilacético (PAA) (Tabla 2), que funciona como un inhibidor más potente de T3SS, por lo que funciona río arriba de los sistemas reguladores de T3SS. Fue reportado que un derivado de PAA, el ácido 3-fenilacético, tiene actividad antifúngica contra *Fusarium sporotrichioides*, *Aspergillus fumigatus* y *Kluyveromyces marxianus*. Aún se desconoce detalladamente la regulación por

PAA en *P. aeruginosa*, pero se considera que funciona como un mecanismo que ayuda a generar infecciones crónicas y persistentes (Dela Ahator y Zhang, 2019).

3.1.6. CDPs en *P. aeruginosa*.

En sobrenadantes del cultivo de *P. aeruginosa* PAO1 se identificó la presencia de los CDPs ciclo (L-Pro-L-Leu), ciclo (L-Pro-L-Phe), ciclo(L-Pro-L-Tyr) y ciclo(L-Pro-L-Val) (Tabla 2). Mediante análisis de genética reversa, se identificaron a 10 posibles genes PSNR como responsables de la síntesis de estos compuestos, entre estos genes se encuentran a las proteínas hipotéticas PA3327 y PA4078, enzimas relacionadas con la síntesis de pioverdina PvdD, PvdJ, PvdI y PvdL, la síntesis de pioquelina PchE y PchF, y de síntesis de IQS como AmbB y AmbE (González et al., 2017). Los ciclodipéptidos se descubrieron por su capacidad de activar biosensores de HSL, aunque se requieren concentraciones muy altas con su sustrato específico, por ejemplo, se requiere una concentración de 0.3 mM de CDPs para la activación de LasR, mientras que sólo se requiere de 1 nM de 3OC12HSL. Incluso, los CDPs ciclo(L-Ala-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Tyr) y ciclo(L-Phe-L-Pro) tienen una actividad antagonista competitiva con 3OC12HSL por la unión con LasR e inhiben los genes regulados por el quórum sensing. Resulta interesante que en algunas cepas bacterianas los CDPs actúan como agonistas y en otras como antagonistas, por ejemplo, ciclo(L-Ala-L-Val) antagonizó la bioluminiscencia de una cepa biosensor de *E. coli* y en *Chromobacterium violaceum* CV026 activó la producción del pigmento violaceína (Dela Ahator y Zhang, 2019). Además del papel de los CDPs en la comunicación bacteriana célula a célula, se les ha atribuido un papel importante en la comunicación entre reinos, donde presentan diferentes efectos. Por ejemplo, en plantas de *A. thaliana*, los CDPs producidos por *P. aeruginosa* PAO1, promueven el crecimiento vegetal mediante la activación de la vía auxínica, mientras que en cultivos celulares de la línea cancerosa HeLa tienen un efecto citotóxico por un mecanismo que involucra la vía Akt/mTOR/S6K (Hernández-Padilla et al., 2017; Ortiz-Castro et al., 2011).

3.2. Regulación del quórum sensing sobre otros sistemas regulatorios.

El QS de *P. aeruginosa* es un sistema de regulación global, bastante complejo, que afecta diversas funciones celulares. En este sentido, parece evidente que el sistema de regulación por QS actúa dentro de una red de regulación global, con múltiples interconexiones (Schuster y Greenberg, 2006). Esta regulación sugiere que la activación de la mayoría de los genes controlados por quórum sensing no es únicamente detonado por la acumulación de la señal o autoinductor, y parece requerir de factores adicionales. De acuerdo con esta hipótesis, se han identificado varios sistemas regulatorios que afectan el quórum sensing mediado por los sistemas *las* y *rhl* en *P. aeruginosa* (Fig 9).

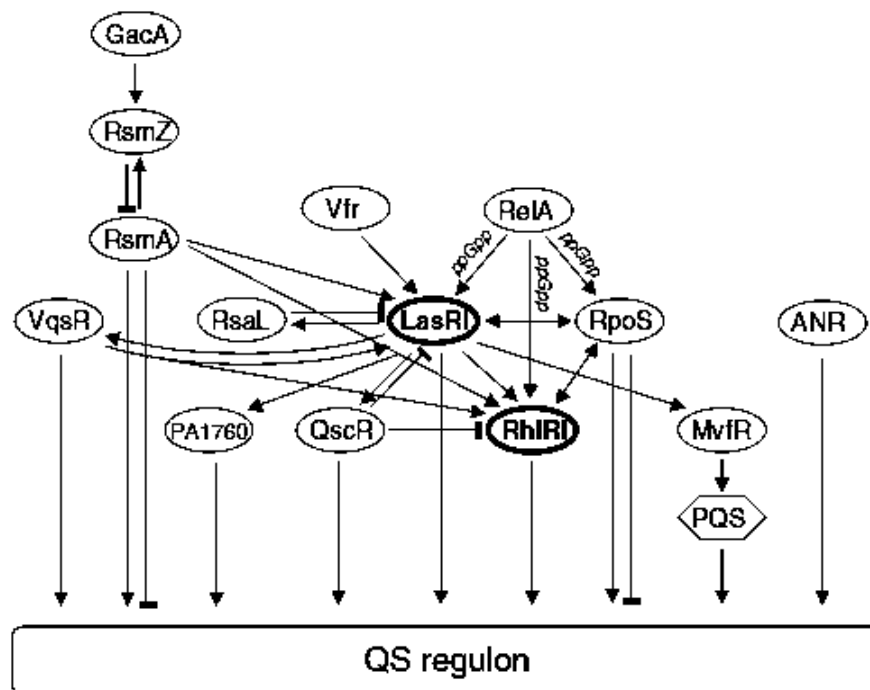


Fig 9. Interconexión del sistema de quórum sensing con otras redes regulatorias en *P. aeruginosa* (tomada de Schuster y Greenberg, 2006).

Las interacciones entre los sistemas regulatorios y el quórum sensing es un tanto ambiguo. Sin embargo, es conocido que existen por lo menos dos niveles de

jerarquía que pueden funcionar para la interconexión de las diferentes señales producidas por *P. aeruginosa*. El regulador del sistema *las*, LasR, representa el punto central con la mayor interconexión de las vías. Esto se fundamenta en el hecho de que regula la expresión de cientos de genes, incluidos algunos de los reguladores dentro de la red de regulación. Un segundo nivel de integración de señales parece ocurrir por los reguladores que tienen una interacción directa con LasR, así teniendo un empalme en los genes que pueden ser regulados por diversos reguladores. Este empalme de diversas vías de señalización que regulan la expresión de genes permite respuestas específicas ante varias condiciones de crecimiento, lo cual puede explicar la excepcional versatilidad y adaptabilidad ambiental de *P. aeruginosa* (Schuster y Peter Greenberg, 2006).

A continuación, se describen algunos de los componentes principales de la red de regulación de *P. aeruginosa* y la ubicación de cada uno de estos componentes se puede observar en la Fig 9.

Vrf. El represor catabólico homólogo Vrf, un regulador global de las funciones de virulencia de *P. aeruginosa*, esta responde a la alarmona AMPc, que induce directamente la transcripción de LasR.

RelA. La proteína de respuesta astringente RelA, es responsable de la síntesis de tetrafosfato de guanosina (ppGpp) bajo condiciones de deficiencia de aminoácidos, lleva a la inducción temprana de muchos procesos controlados por quórum sensing, producción de HSL, así como la expresión de *lasR* y *rhIR*.

GacAS/RsmAZ. El sistema regulatorio de dos componentes GacA/GacS afecta el quórum sensing post-transcripcionalmente a través del pequeño ARN regulatorio RsmZ y la proteína de unión a ARN RsmA. RsmZ, el cual es activado por GacA, antagoniza la actividad de RsmA. En ausencia de RsmZ, RsmA reprime la síntesis de señales HSL. RsmA también regula la producción de muchos factores de

virulencia controlados por quórum sensing, reprimiendo a algunos (ácido cianhídrico y piocianina) e induciendo a otros (lipasa y ramnolípidos).

ANR. El regulador anaeróbico ANR, activa la expresión de los genes biosintéticos del ácido cianhídrico *hcnABC* que son controlados por quórum sensing. La activación ocurre en conjunto con LasR y RhIR y requiere un elemento de secuencia conservado, llamado caja FNR/ANR, en la región regulatoria río arriba de *hcnABC*. ANR parece ser un factor importante en la co-regulación de genes controlados por quórum sensing bajo condiciones limitadas de oxígeno.

RsaL. El gen *rsaL*, que es activado directamente por LasR, codifica para una proteína de 11 kDa que se ha visto que inhibe el quórum sensing al reprimir la transcripción de *lasI*.

RpoS. El factor sigma de fase estacionaria RpoS, afecta la expresión del 40 % de los genes controlados por quórum sensing, la mayoría de los genes son inducidos, pero algunos otros son reprimidos. RpoS puede regular directamente la expresión de genes controlados por quórum sensing.

QscR. *P. aeruginosa* posee a QscR que es un tercer regulador tipo Lux, el cual carece de una sintetasa cognada, por lo que puede activarse en respuesta a HSL de otras especies bacterianas. Parece que QscR retrasa la activación de genes controlados por quórum sensing a través de la formación de heterodímeros con LasR y RhIR. Sin embargo, también puede actuar como activador transcripcional de genes blanco.

VqsR. El regulador transcripcional VqsR, que es activado por LasR, es esencial para la producción de HSL y la expresión de muchos genes regulados por quórum sensing. VqsR es miembro de la superfamilia de los factores transcripcionales FixJ-NarL, que son similares a las proteínas tipo LuxR, pero sin el dominio de unión a HSL.

MvfR. La proteína MvfR activa los genes requeridos para producir el precursor directo de PQS, y está bajo control de LasR, además hay un gran empalme entre los regulones del quórum sensing y MvfR, principalmente regula genes controlados por el sistema *rhl* sin afectar la producción de señales de HSL o la expresión de *lasR* y *rhlR*.

4. Proteína cinasa TOR

La proteína blanco de la rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés) es una proteína cinasa evolutivamente conservada relacionada a la cinasa de 3-fosfoinositol (PI3K), que controla múltiples procesos celulares como el metabolismo, ciclo celular, autofagia y síntesis de proteínas, bajo varios estímulos intra y extracelulares (Dobrenel et al., 2016; Rexin et al., 2015; Tatebe y Shiozaki, 2017). La proteína TOR consta de 5 dominios conservados, en el extremo amino se encuentra el dominio de repeticiones HEAT (Huntinting, factor de Elongación 3, proteína fosfatasa 2A y cinasa TOR1 de levaduras), seguido del dominio FAT (FRAP, ATM y TRRAP o dominio de adhesión focal), el dominio FRB (FKBP12, proteína 12 de unión a fármacos/unión a rapamicina), un dominio cinasa Ser/Thr y un dominio FATC en extremo carboxilo (Fig 10a) (Bakshi et al., 2019). La secuencia de la proteína TOR de *Arabidopsis* (AtTOR) comparte una conservación de dominios de alrededor de 40% con TOR de levaduras (ScTOR) y mamíferos (mTOR). Por ejemplo, la similitud entre los dominios FATC es de alrededor del 70%, la secuencia del dominio cinasa de TOR de plantas y humanos comparten una similitud de alrededor de 75% (Xiong y Sheen, 2014), mientras que el dominio FRB de *Arabidopsis* tiene una conservación muy baja y esta puede ser la causa de la insensibilidad a la rapamicina en este organismo (Bakshi et al., 2019), por lo que en plantas es necesario el uso de inhibidores competitivos de ATP de nueva generación como AZD8055, Torin1 y 2, KU-63794, PP242, etc (Montané y Menand, 2019). En cuanto a la función de los dominios, el dominio FAT provee estabilidad estructural y está involucrado en interacciones proteína-proteína, en el dominio FRB se lleva a cabo la inhibición de

la proteína por la unión con el complejo rapamicina/FKBP12 y FK506 (Fig 10b), el dominio cinasa Ser/Thr se encarga de la actividad cinasa de la proteína y el dominio FATC cumple funciones similares a FAT (Bakshi et al., 2019; Rexin et al., 2015).

TOR está codificado en un solo gen en mamíferos y plantas, mientras que, en levaduras existen dos genes que codifican para la proteína TOR (Shimobayashi y Hall, 2014). Para llevar a cabo su función, TOR se puede asociar con diferentes proteínas con las que forma dos complejos diferentes en función y composición TORC1 y TORC2, que han sido identificados en levaduras y mamíferos (Bakshi et al., 2019; Rexin et al., 2015; Ryabova et al., 2019; Shimobayashi y Hall, 2014). Mientras que, en plantas no se ha podido determinar la presencia de TORC2, por lo que se considera que solo cuenta con TORC1 (Bakshi et al., 2019; Rexin et al., 2015). Los componentes esenciales de TORC1 son las proteínas TOR, la proteína reguladora asociada a TOR (RAPTOR) y la proteína letal con SEC13-8 (LST8); TORC2 está formado por las proteínas TOR, la proteína acompañante de TOR insensible a rapamicina (RICTOR), la proteína 1 de interacción con SAPK (SIN1) y LST8 (Fig 10c) (Shimobayashi y Hall, 2014). A estos componentes esenciales se pueden sumar otros componentes según el organismo al que se haga referencia (Bakshi et al., 2019).

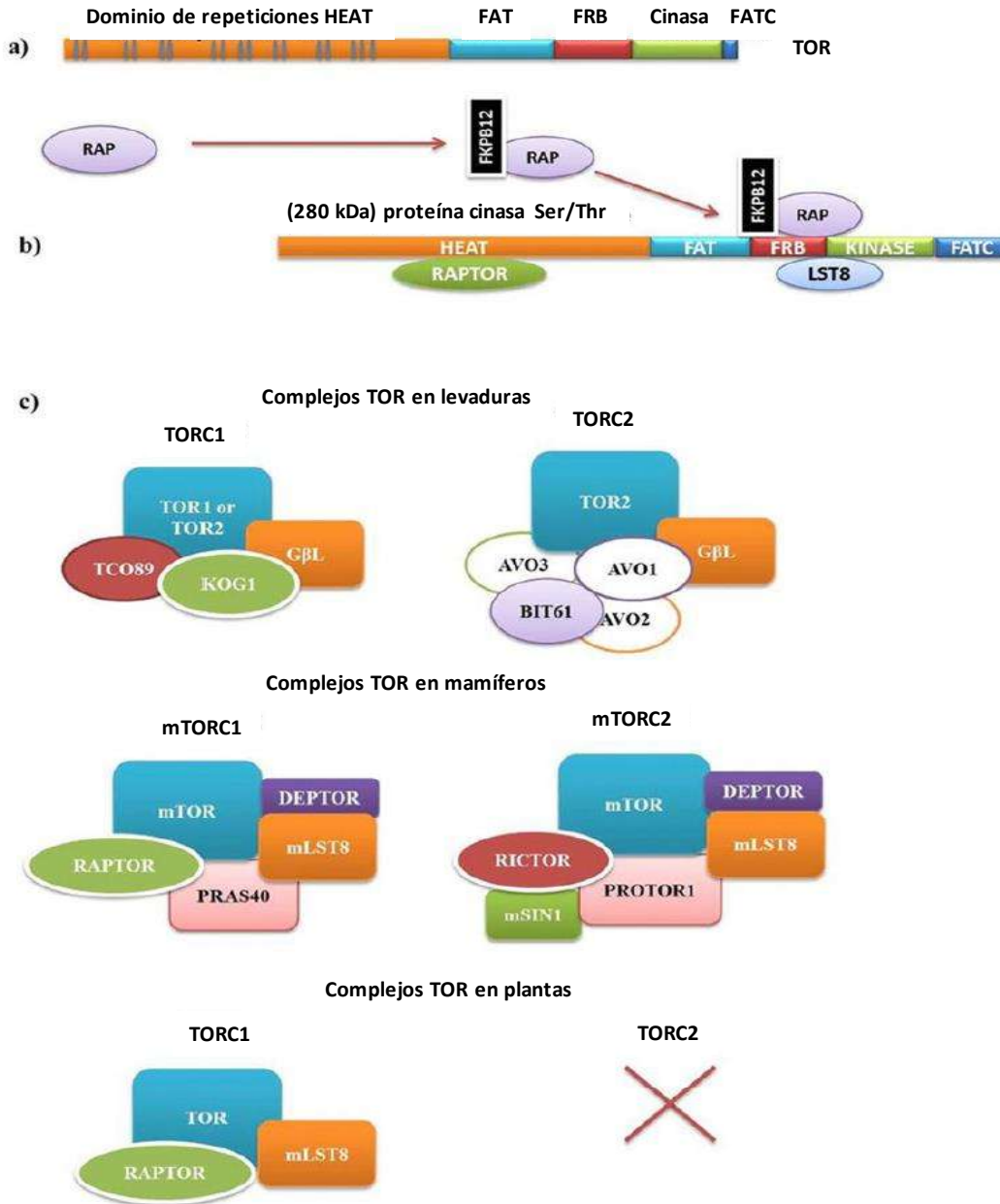


Fig 10. Estructura de TOR y sus complejos. a) TOR se conforma de 5 dominios: dominio de repeticiones HEAT, dominio FAT, dominio FRB de unión a rapamicina, dominio cinasa Ser/Thr y dominio FATC. b) La unión del complejo rapamicina-FKBP12 al dominio FRB de TOR resulta en la inactivación de TOR. c) TOR puede formar dos complejos distintos en levaduras y mamíferos TORC1 y TORC2, mientras que en plantas no está clara la existencia de un complejo TORC2 (tomada de Bakshi et al., 2019).

La vía de TOR ha sido ampliamente estudiada, principalmente en mamíferos y levaduras, donde se han encontrado una gran cantidad de componentes de dicha vía. mTORC1 puede ser activado por factores de crecimiento (por ejemplo, insulina), nutrientes (como aminoácidos) y por el estado energético (alta disponibilidad de ATP) (Fig 11) (Bakshi et al., 2019; Shimobayashi y Hall, 2014). Los factores de crecimiento, como la insulina, activan a mTORC1 a través de la vía PI3K-cinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos (PDK1)-AKT, denominada como vía clásica. Posteriormente AKT fosforila al complejo 2 de esclerosis tuberosa (TSC2, también llamado tuberina) para inducir la inhibición de TSC1 (también llamado hamartina) por disociación del complejo TSC, este complejo actúa como una proteína activadora de GTPasa (GAP) de la proteína GTP pequeña homóloga de RAS enriquecida en cerebro (RHEB). Cuando RHEB está cargada con GTP, se une al dominio catalítico de mTOR para activar a TORC1 por un mecanismo aún desconocido (Shimobayashi y Hall, 2014; Tatebe y Shiozaki, 2017). La regulación de mTOR por aminoácidos, es llevada a cabo por un heterodímero RAG, que media la translocación de TORC1 del citoplasma hacia el lisosoma, donde puede ser activado por RHEB. Para el caso de la regulación por disponibilidad de energía, se determina por la relación ATP/AMP. Cuando hay una relación baja ATP/AMP (baja energía), la proteína cinasa dependiente de AMP (AMPK) fosforila a TSC2 en Ser-1387 y a RAPTOR en Ser-792, que lleva a la inhibición de mTORC1 (Shimobayashi y Hall, 2014). Una vez que TORC1 está activo, fosforila a diferentes proteínas blanco, regulando diferentes procesos celulares como la autofagia, la respuesta al estrés, el ensamblaje de polisomas, la función mitocondrial, el metabolismo de glucosa, el ciclo celular y la síntesis de proteínas. Entre los blancos mejor caracterizados está la cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K). Una vez que S6K es activada, fosforila a la proteína ribosomal S6 (S6RP) y de esta manera es inducida la síntesis de proteínas al promover la traducción de ARNm que contienen una etiqueta de oligopirimidinas en 5' (5' TOP). Entre los ARNm que contienen 5'

TOP se encuentran componentes de la maquinaria de traducción, como proteínas ribosomales y factores de elongación (Shimobayashi y Hall, 2014; Tatebe y Shiozaki, 2017).

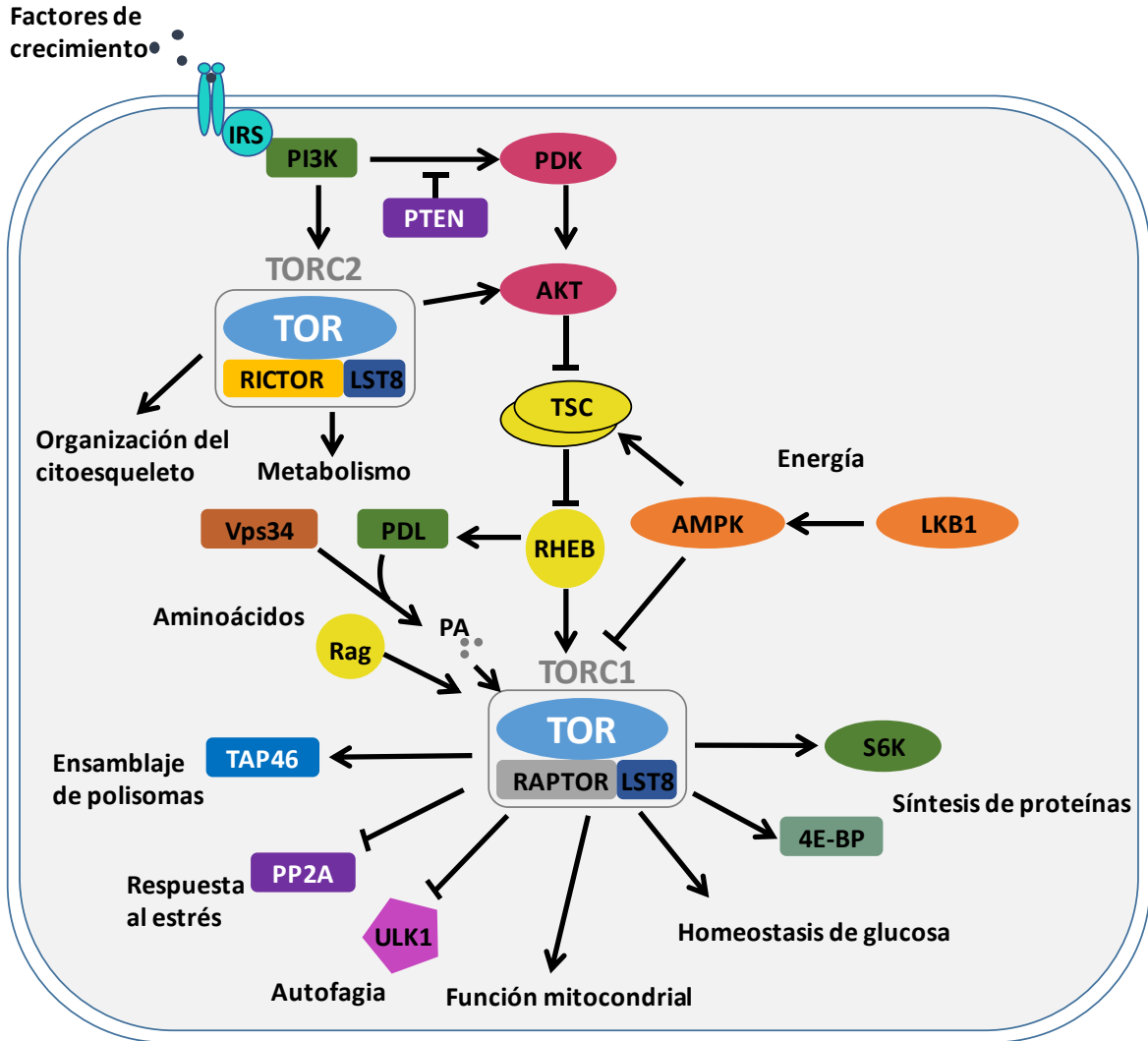


Fig 11. Vía de señalización de TOR en mamíferos (mTOR). Las flechas indican activación y las líneas truncas indican inhibición (modificada de Bakshi et al., 2019).

En cuanto a la regulación de TORC2, es poco lo que se conoce en comparación a la regulación de TORC1. Se sabe que la actividad cinasa de TORC2 es activada por factores de crecimiento, por una vía que depende de PI3K (Fig 11). TORC2

regula procesos como la organización del citoesqueleto, la polarización de actina y está implicado en la regulación del metabolismo (Shimobayashi y Hall, 2014).

4.1. Vía de TOR en plantas

La vía de TOR es esencial para la regulación del crecimiento y desarrollo, procesos que requieren ser altamente regulados y por lo cual, la vía de TOR participa en todas las etapas de crecimiento y desarrollo importantes durante el ciclo de vida de las plantas, desde la germinación, el crecimiento vegetativo, la floración, hasta la senescencia (Quilichini et al., 2019). Como se mencionó anteriormente, la mayor parte del conocimiento de la vía de TOR se ha obtenido por el estudio de la vía en mamíferos y levaduras. A pesar de que se han realizado un gran número de investigaciones de la vía de TOR en plantas, no se han logrado encontrar ortólogos funcionales para todos los componentes de la vía encontrados en mamíferos y levaduras, por ejemplo, en plantas no se han encontrado proteínas ortologas para formar un TORC2. Para explicar esto, se ha hipotetizado que la divergencia en la vía de TOR proviene del último ancestro eucarionte común (LECA), cuando existió la divergencia evolutiva que dio origen a plantas y algas, y se considera que TORC2 se originó después de este suceso (Tatebe y Shiozaki, 2017). A pesar de la aparente ausencia de TORC2 en plantas, se han identificado homólogos de los componentes de TORC1, además de TOR, están presentes RAPTOR (*RAPTOR1* y *RAPTOR2*) y LST8 (*LST8-1* y *LST8-2*). La vía de señalización de TOR en plantas responde a señales como la luz, estrés biótico y abiótico, disponibilidad de energía (ATP) y nutrientes (como aminoácidos), factores de crecimiento (similares a insulina) y hormonas (como auxinas) (Rexin et al., 2015; Schepetilnikov y Ryabova, 2017b).

mTORC1 puede ser activado por glucosa para inducir el crecimiento de la raíz (Xiong y Sheen, 2014). Además de la glucosa, otros nutrientes funcionan como reguladores de la vía de TOR. Por ejemplo, leucina y arginina activan la vía por diferentes sensores, pero convergen en la activación de GTPasas RAG

heterodiméricas para reclutar a TORC1 a la membrana lisosomal, donde las GTPasas RAG se asocian con el complejo Regulador, v-ATPasa y RHEB, por lo que actúan como activador de mTOR. Aunque, las plantas carecen de estos sensores de aminoácidos de mamíferos y RAGs, los aminoácidos pueden activar la señalización de TOR en plantas (Shi et al., 2018; Tatebe y Shiozaki, 2017). También los niveles de otros nutrientes como nitrógeno, fosfato y azufre funcionan como reguladores de la actividad de TOR en plantas (Shi et al., 2018; Wu et al., 2019).

Se ha reportado ampliamente la activación de la vía de señalización de TOR por factores de crecimiento en levaduras y mamíferos. Aunque, en plantas se ha identificado un factor de crecimiento similar a insulina, y este es capaz de activar la vía (Reyes de la Cruz et al., 2004), las plantas producen otros factores de crecimiento y hormonas que son funcional y estructuralmente diferentes a mamíferos y levaduras. De las principales hormonas vegetales reguladoras del crecimiento en plantas podemos encontrar a las auxinas, las cuales pueden activar la señalización de TOR a través de la proteína G pequeña tipo Rho, ROP2 (Schepetilnikov y Ryabova, 2017a). Las señales de luz, glucosa y auxinas, actúan de manera sinérgica en la activación de TOR. Por el contrario, la vía de señalización del ácido abscísico (ABA) inhibe la vía de TOR, a través de la fosforilación de RAPTOR por SnRK2 (Bakshi et al., 2019).

A pesar de que varios componentes de la vía de TOR en plantas está ausente, existe una gran conservación de las proteínas blanco de TOR, por lo que la vía de señalización de TOR en plantas participa en la regulación de procesos similares a los reportados en levaduras y mamíferos (Fig 12). Al igual que en mamíferos, uno de los blancos más ampliamente estudiados es la cinasa S6K (Rexin et al., 2015). En *Arabidopsis thaliana*, S6K es una cinasa Ser/Thr homóloga funcional y estructuralmente a p70S6K de humanos, que está codificada por dos genes, S6K1 y S6K2, las cuales tienen una gran similitud en su secuencia y por splicing se pueden producir dos isoformas de cada una, p70 y p85 de S6K1 y, de S6K2 se

pueden obtener p54 y p56 (Turck, 2004; Yaguchi et al., 2020). Las S6Ks de mamíferos contienen cuatro dominios, el dominio amino terminal, el dominio cinasa, la región enlazadora y el dominio carboxilo terminal. Las S6Ks de plantas, comparadas con mamíferos, contienen un dominio amino terminal más largo, no contiene un dominio carboxilo terminal, pero conserva una alta homología en el dominio cinasa y conservación en los tres sitios importantes de fosforilación, el sitio T-loop, el sitio TM y el sitio HM (Fig 13). La fosforilación del sitio HM es mediada por TOR y la fosforilación del sitio T-loop es mediada por PDK1 y se considera que la fosforilación en el sitio TM es mediada por TOR, aunque aún no se conoce a detalle (Yaguchi et al., 2020). La fosforilación ocurre en orden jerárquico, ocurriendo primero la fosforilación en TM y después puede ser fosforilado el sitio T-loop (Turck, 2004). Una vez que S6K es fosforilado, se considera es completamente activa y desarrolla su actividad cinasa sobre varias proteínas blanco, la primeramente descubierta y más estudiada es la proteína ribosomal S6 (S6RP) que es fosforilada en S240 por S6K. Una vez que S6RP es activada induce la síntesis de proteínas, por la traducción de ARNm que poseen una región no traducida (uORF) en su extremo 5' (5' UTR) (Schepetilnikov y Ryabova, 2017a).

Factores de crecimiento

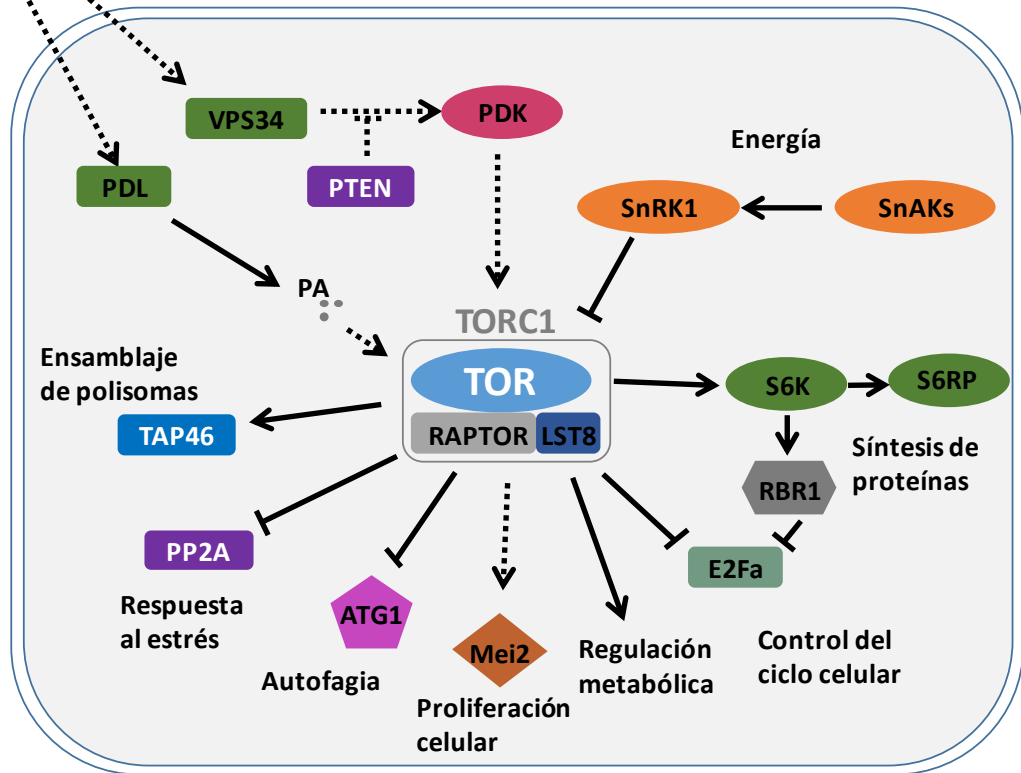


Fig 12. Vía de señalización de TOR en plantas. Las líneas sólidas indican que se ha demostrado experimentalmente, las líneas discontinuas que el mecanismo no se ha sido descrito a detalle, las flechas indican activación y las líneas trancas inhibición (modificada de Bakshi et al., 2019).

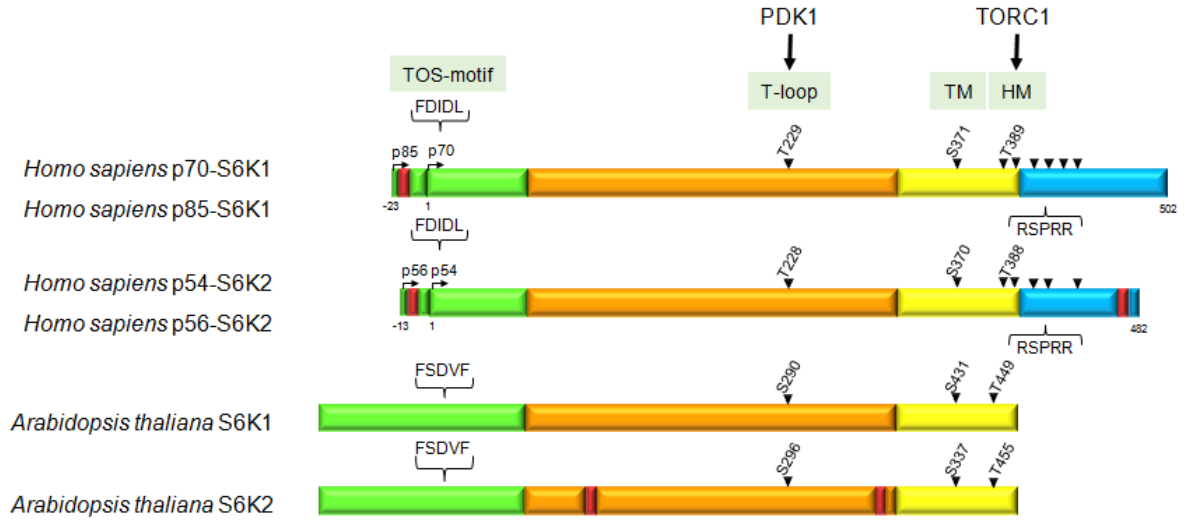


Fig 13. Comparación entre los dominios de S6K de humanos y *A. thaliana*. Se representan los dominios, motivos y sitios de fosforilación importantes de las isoformas de S6K1 (p70 y p85) y S6K2 (p54 y p56) de humanos y S6K1 y S6K2 de *A. thaliana* (tomado de Yaguchi et al., 2020).

III. JUSTIFICACIÓN

Durante la interacción planta-microorganismo existen diferentes eventos de comunicación. Específicamente, durante la interacción entre *P. aeruginosa* y *A. thaliana* ocurre la regulación vegetal por sustancias liberadas por la bacteria conocidas como ciclodipéptidos. Sin embargo, se han descrito parcialmente las vías de señalización que participan durante la regulación del crecimiento vegetal.

La vía de TOR se ha considerado como uno de los reguladores maestros del crecimiento, por lo que es de nuestro interés estudiar la participación de esta vía en el desarrollo inducido en *A. thaliana* por la interacción con *P. aeruginosa* y mutantes afectadas en la producción de CDPs.

IV. HIPÓTESIS

Los ciclodipéptidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* promueven el desarrollo de la raíz primaria y la maduración de primordios de raíces laterales de *Arabidopsis thaliana* a través de la activación de la ruta TOR/S6K.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la participación de los ciclodipéptidos de *Pseudomonas aeruginosa* en la activación la ruta de señalización TOR/S6K de *Arabidopsis thaliana* durante la promoción del desarrollo.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* sobre el crecimiento y la proliferación celular de la raíz de plantas de *A. thaliana*.
2. Determinar el efecto de los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* sobre la actividad de la vía TOR/S6K durante la inducción del desarrollo de *A. thaliana*.

VI. Resultados

Los resultados más importantes obtenidos durante el presente proyecto se muestran divididos en los siguientes capítulos. El capítulo 1 corresponde al artículo publicado más recientemente en *Journal of Plant Physiology* titulado “Growth promotion in *Arabidopsis thaliana* by bacterial cyclodipeptides involves the TOR/S6K pathway activation”, en donde se participó como primer autor. El capítulo 2 corresponde al artículo publicado en 2019 en *PeerJ* titulado “Cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* modulate the maize (*Zea mays* L.) root system and promote S6 ribosomal protein kinase activation”, donde se participó como segundo autor. El capítulo 3 corresponde al artículo publicado en 2016 con el título “Non-ribosomal Peptide Synthases from *Pseudomonas aeruginosa* Play a Role in Cyclodipeptide Biosynthesis, Quorum-Sensing Regulation, and Root Development in a Plant Host”, donde se participó como primer autor. Finalmente, los capítulos 4 y 5 corresponden a los artículos de divulgación publicados en la revista de divulgación *Saber más* titulados “*Quorum sensing* o percepción del *quorum*” y “Una bacteria “mala” que también es “buena””.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Plant Physiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jplph



Growth promotion in *Arabidopsis thaliana* by bacterial cyclodipeptides involves the TOR/S6K pathway activation

Omar González-López, Brenda Berenice Palacios-Nava, César Arturo Peña-Urbe, Jesús Campos-García, José López-Bucio, Ernesto García-Pineda, Homero Reyes de la Cruz*

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Bl. B1, B3, A1, U3, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán, CP 58000, México

ARTICLE INFO

Keywords:
Cyclodipeptides
Plant growth promotion
Plant-bacteria interaction
TOR/S6K pathway

ABSTRACT

Cyclodipeptides (CDPs) are the smallest peptidic molecules that can be produced by diverse organisms such as bacteria, fungi, and animals. They have multiple biological effects. In this paper, we examined the CDPs produced by the bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, which are known as opportunistic pathogens of humans and plants on TARGET OF RAPAMYCIN (TOR) signaling pathways, and regulation of root system architecture. This bacterium produces the bioactive CDPs: cyclo(L-Pro-L-Leu), cyclo(L-Pro-L-Phe), cyclo(L-Pro-L-Tyr), and cyclo(L-Pro-L-Val). In a previous report, these molecules were found to modulate basic cellular programs not only *via* auxin mechanisms but also by promoting the phosphorylation of the S6 ribosomal protein kinase (S6K), a downstream substrate of the TOR kinase. In the present work, we found that the inoculation of *Arabidopsis* plants with *P. aeruginosa* PAO1, the non-pathogenic *P. aeruginosa* *ΔlasI/ΔrhII* strain (JM2), or by direct exposure of plants to CDPs influenced growth and promoted root branching depending upon the treatment imposed, while genetic evidence using *Arabidopsis* lines with enhanced or decreased TOR levels indicated a critical role of this pathway in the bacterial phytostimulation.

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa, a well-known, ubiquitous, opportunistic human and plant pathogen, proliferates in the rhizosphere —the soil zone influenced by root exudates (Plotnikova et al., 2000; Rahme et al., 1995). *Pseudomonas aeruginosa* overcomes host defenses through the production of toxins, adhesins, pyocyanin, cyclodipeptides (CDPs), and other virulence factors (Ahtor and Zhang, 2019). Cyclodipeptides are cyclized molecules comprising two amino acids linked by peptide bonds, and they are produced by a wide range of organisms, from bacteria to fungi and animals (Canu et al., 2018; Mishra et al., 2017). These molecules belong to a wide group of organic substances capable of modulating quorum sensing and cross-kingdom interactions in evolutionarily distant organisms such as bacteria and plants (González and Keshavan, 2006; Ortiz-Castro et al., 2011). It has been shown that mutants of *P. aeruginosa* that overproduce the CDPs cyclo(L-Pro-L-Val), cyclo(L-Pro-L-Leu), and cyclo(L-Pro-L-Tyr), such as the JM2 (*ΔlasI/ΔrhII*) strain, promote plant growth and development, partly because these molecules fit well into the auxin pocket of the TIR1 receptor protein,

acting as auxin signal mimics in *Arabidopsis thaliana* (González et al., 2017; Ortiz-Castro et al., 2011).

Plant growth and development require the activation of the target of rapamycin (TOR) pathway, which is the master regulator of growth in eukaryotes (Rexin et al., 2015). The TOR pathway plays a central role in the perception of extracellular stimuli, such as growth factors and nutrients and internal stimuli (such as energy levels and cellular damage) and regulates a variety of processes, such as metabolism, cell cycle, autophagy, and protein synthesis (Deprest et al., 2007; Dobrenel et al., 2016; Rexin et al., 2015). We previously reported that the S6K protein in maize plants (*ZmS6K*), which is a downstream target of TOR, was activated by the CDPs produced by *P. aeruginosa* (Corona-Sánchez et al., 2019). The *Arabidopsis* genome contains two nearly identical genes, termed *AtS6k1/Atpk1/ATPK6* and *AtS6k2/Atpk2/ATPK9* (Turek et al., 2004). Both proteins, S6K1 (~52 kDa) and S6K2 (~53 kDa), are able to phosphorylate S6 ribosomal protein, but only S6K1 has been extensively studied, whereas S6K2 functions are less well-known (Bakshi et al., 2019; Turek et al., 2004). Thus, it is possible to dissect the plant response and the auxin-TOR interaction underlying the probiotic effects of CDPs

* Corresponding author.

E-mail address: delacruz@umich.mx (H. Reyes de la Cruz).

in *Arabidopsis thaliana*, a plant amenable to genetic analysis. In the present study, we report that plant growth promotion in the *Arabidopsis-Pseudomonas* interaction system required the activation of AtS6K protein and that the CDPs produced by *P. aeruginosa* were responsible for this activation. The effect of CDPs on plant cell proliferation showed by the induction of cyclin B1 (*CYCB1*) expression indicates that the activation of the TOR pathway is involved.

2. Materials and methods

2.1. Culture conditions

Pseudomonas aeruginosa PAO1 (WT) and JM2 (*Δlasi/ΔrhII*) were grown in LB broth or minimal medium M9 with 0.2 % glucose at 30 °C and supplied with or without 1% agar. For *P. aeruginosa* selection, we used 200 μg/mL streptomycin and 60 μg/mL tetracycline for WT and JM2, respectively.

2.2. Plant growth conditions

Arabidopsis thaliana Col-0, G548 (over-expressing TOR, OX-TOR) (Deprost et al., 2007), and *tor-es* (estradiol-inducible *tor* mutant) (Xiong et al., 2013) seeds were surface-sterilized with 70 % (v/v) ethanol for 5 min and a 20 % (v/v) commercial bleach solution for 5 min. After seven washes with sterile distilled water, vernalization at 4 °C was carried out for 48 h. The seeds were germinated and grown on agar plates containing a 0.2x Murashige and Skoog (MS) medium (0.866 g/L of salts lacking amino acids and vitamins, 10 g/L phytagar [micro-propagation grade], and 6 g/L sucrose). Plants were placed in a plant growth chamber (Percival Scientific AR-95 L, Perry, Iowa, USA) with a photoperiod of 16/8 h light/darkness (light intensity of 100 μmol m⁻²/s), 80 % humidity, and a temperature of 22 °C.

2.3. Arabidopsis-Pseudomonas interaction assay

Six-day-old *A. thaliana* seedlings were inoculated at 5 cm or 1 cm from the root tip by placing a bacterial streak at a density of 2.5×10^8 colony forming units (CFU), as described by (González et al., 2017). The seedlings in the interaction system were grown for a further 10-day period by placing the plates in the growth chamber.

2.4. Cytoplasmic protein extraction

Arabidopsis thaliana seedlings from different treatments were ground in liquid nitrogen, and the powder was transferred to a tube containing an extraction buffer (σ -sodium vanadate 1 mM, sodium molybdate 1 mM, benzamidine 1 mM, sodium fluoride 20 mM, phenylmethylsulfonyl fluoride 0.2 mM, dithiothreitol 2 mM, 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid 50 mM, pH 7.6). After vortexing, the homogenate was centrifuged at 9000 × g at 4 °C for 30 min. The supernatant was recovered and protein quantified using the Bradford method (Bradford, 1976).

2.5. Protein gel blot analyses

Protein extract samples were resolved by a 12 % SDS-PAGE and blotted on Polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Millipore, Burlington, MA, USA). Membranes were incubated with anti-AtS6K polyclonal antibody (1:1000 dilution) (Agriseria AS12 1855) or anti-AtS6K phosphorylated polyclonal antibody (1:1000 dilution) (Agriseria AS13 2664) at 4 °C overnight. Then the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:3000 dilution) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) at room temperature (–25 °C). The peroxidase reaction was revealed using luminol and detected in a ChemiDoc™ XRS + system (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Densitometry analysis of the resulting dots was performed

using Image Lab software (Bio-Rad Laboratories).

2.6. Two-dimensional electrophoresis

After treatment, the plant tissues were ground in liquid nitrogen, and the powder was transferred to a tube containing an extraction buffer (phenol 50 % [v/v], EDTA 10 mM, sucrose 900 mM, β -mercaptoethanol 0.4 % [v/v], σ -sodium vanadate 5 mM, sodium fluoride 5 mM, β -sodium glycerophosphate 25 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8.8), homogenized, and centrifuged at 9000 × g at 4 °C for 15 min. The organic phase was recovered and washed with this extraction buffer. A precipitation solution (100 mM ammonium acetate on methanol) in a proportion of 1:4 was added and it was allowed to sit overnight at –20 °C. Subsequently, a pellet was obtained by centrifugation at 9000 × g at 4 °C for 15 min. The pellet was washed three times with precipitation solution, and a final wash with 80 % cold acetone was carried out. After washing, centrifugation was performed at 9000 × g at 4 °C for 10 min. The resulting pellet was dissolved in isoelectric focusing buffer (8 M urea, 4% CHAPS [w/v], 7 mM dithiothreitol, 2% ampholytes pH 3–10 [w/v]) and proteins were quantified according to the 2-D Quant Kit (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) specifications.

For overnight rehydration of 13 cm strips, 200 μg of each protein sample was used with an immobilized pH gradient of 3–10 (IPG DryStrip pH 3–10 NL, 13 cm, GE Healthcare Life Sciences). Isoelectric focusing was performed until 18,000 Vh was reached in an Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit, for the first-dimension separation. Afterward, the strips were subjected to 12 % SDS-PAGE for the second-dimension separation. Then, the resulting gels were blotted on PVDF membranes (Millipore), and the membranes were incubated with an anti-ZmS6K polyclonal antibody (1:1000 dilution) (Abbtotec, San Diego, CA, USA) at 4 °C overnight. Next, the membrane was incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:3000 dilution) (Bio-Rad Laboratories, Inc.) at room temperature for 2 h. The peroxidase reaction was revealed using luminol and detected in a ChemiDoc™ XRS + system (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Densitometry analysis of the resulting immunoblots was performed using Image Lab software (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

2.7. Transgenic plant analyses

Transgenic *A. thaliana* *CycB1::uidA* (Colón-Carmona et al., 1999) that express the *uidA* reporter gene (Jefferson et al., 1987) was processed in 0.1 % 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-Gluc), dissolved in phosphate buffer (0.1 M Na₂HPO₄, 0.1 M Na₂HPO₄, pH 7), and supplemented with 2 mM potassium ferrocyanide (K₄[Fe(CN)₆]·3H₂O) and 2 mM potassium ferricyanide (K₃[Fe(CN)₆]) for 18 h at 37 °C. Plants were cleared and fixed as previously described (Malamy and Benfey, 1997). At least 10 transgenic plants were analyzed for each marker line and for each treatment.

2.8. Cyclodipeptide preparation

The extraction of CDPs was performed as previously reported by Hernández-Padilla et al. (2017) (Hernández-Padilla et al., 2017). In brief, 2.5×10^8 CFU of *P. aeruginosa* WT or JM2 were cultured in 100 mL of minimal medium M9 and incubated in a growth cabinet for 24 h at 30 °C. Cell-free supernatants were extracted by centrifugation at 10,000 × g at 23 °C for 15 min. The resulting supernatant was extracted twice with two volumes of ethyl acetate plus acetic acid (0.1 mL/L). The extracts were evaporated to dryness in a rotavapor at 60 °C under vacuum and weighted. The residue was dissolved in 1 mL of acetonitrile for characterization by high-performance liquid chromatography (HPLC), which was performed using a photodiode array detector and a Sephasil-Peptide C18, 12 μm, 4.6 mm × 250 mm (Amersham) reverse-phase HPLC column for the sample analysis. Fractions were eluted with water/acetonitrile, starting with an equilibration solvent mix of 0:100,

followed by a linear gradient of 60:40, with a flow of 1 mL/min for 15 min. Finally, the mixture was returned to 0:100 solvent mix for 3 min and an equilibrium phase for 2 min. The resulting peaks were corroborated with standards cyclo(L-Pro-L-Val), cyclo(L-Pro-L-Phe), and cyclo(L-Pro-L-Tyr) (Bachem Co., Torrance, CA, USA). CDPs quantitation was assessed by comparing the area units from each CDP peak showed in chromatograms from the HPLC analysis with those of its corresponding standard. The proportion of each CDP in the mix was 0.75:1.0:0.75, respectively.

3. Results

3.1. Cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* induced changes in *Arabidopsis thaliana* root architecture

To determine the ability of CDPs to induce growth and development, CDPs were extracted from the *P. aeruginosa* growth medium with solvents according to Hernández-Padilla et al. (2017), and a mixture of CDPs was obtained. Then, 4-day-old *A. thaliana* Col-0 were transferred on solidified MS (0.2x) supplemented with the CDP mix (in concentrations ranging from 0.1–100 µg/mL) and incubated for 8 days (Fig. 1a). We observed a significant increase in primary root growth, lateral root number and biomass production in 1 and 10 µg/mL of CDP mix (Fig. 1).

In contrast, at 100 µg/mL, primary root length was observed to decrease. Thus, CDPs reconfigured root architecture in a dose-dependent manner.

3.2. Cyclodipeptides activate cell proliferation

Cell proliferation in the meristematic zone is a key process in root growth. To determine whether the effect of CDPs involves this process, the expression of the mitotic marker *CYCBI* was analyzed. To this end, six-day-old *Arabidopsis thaliana* *CycBI::uidA* seedlings were treated with the CDP mix for 24 h, and GUS activity was determined (Fig. 2). It was observed that *CycBI::uidA* seedlings treated with 1 and 10 µg/mL of CDPs showed increased cell division in the primary root meristem compared with non-treated plants (Fig. 2a and c). Moreover, the exposure of seedlings to 100 µg/mL of CDPs for 8 days showed that *CycBI* expression was drastically reduced in primary root meristems (Supplementary Fig. 1a, upper panel), correlating with the marked reduction in primary root length (Fig. 1). Additionally, we evaluated the lateral root primordium (LRP) maturation stages according to Jing and Strader (2019), and analyzed the *CYCBI* expression in the primary root and lateral root meristems in four-days *CycBI::uidA* germinated seedlings transferred to solidified MS supplemented with the CDP mix and growth for 8 days as in Fig. 1. It was observed that after 8 days, CDPs induced LRP maturation (Supplementary Fig. 1b) and increased cell division in

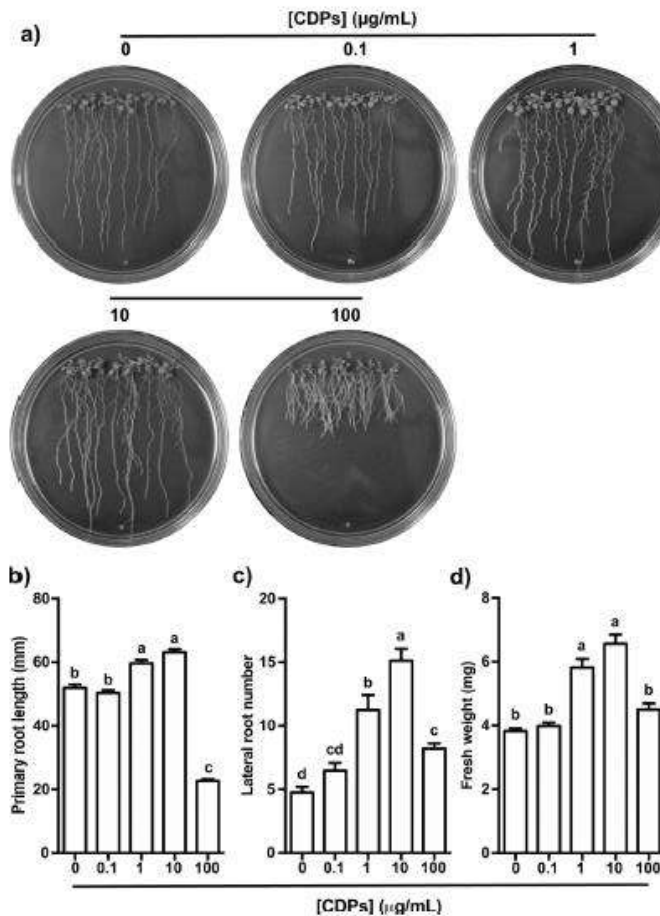


Fig. 1. Effect of cyclodipeptides (CDPs) on the growth and development of *Arabidopsis thaliana*. a) Four-day-old *A. thaliana* Col-0 were transferred to 0.2x MS containing CDPs and incubated for 8 days in a growth chamber. Quantitative data of b) primary root length, c) lateral root number, and d) fresh weight. Data are presented as mean \pm SE ($n = 10$). Different letters represent statistically different means in a one-way ANOVA, with a post-hoc Tukey test ($P \leq 0.05$). The experiment was repeated three times, with similar results.

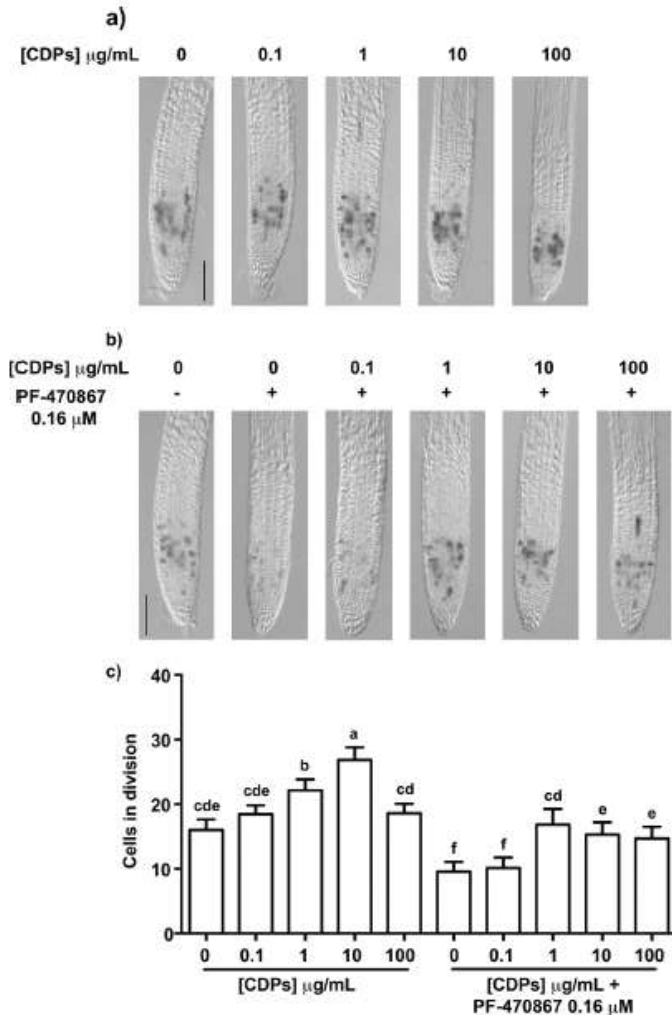


Fig. 2. Cyclodipeptides (CDPs) induced *CYCB1* expression. Representative photographs of *CYCB1:uidA* expression of 6-day-old seedling roots treated for 24 h with a) CDPs or b) CDPs + PF-470867 160 nM. The scale bar represents 100 µm. c) Number of dividing cells in the root meristem. Data are presented as mean \pm SD ($n = 7$). One-way ANOVA, with a post-hoc Tukey test ($P \leq 0.05$) was performed. Different letters represent statistically different means. The experiment was repeated twice, with similar results.

primary root and in the mature lateral root meristem at 10 µg/mL (Supplementary Fig. 1a), further indicating that at this concentration the CDPs mix induce root growth by stimulating LRP maturation and increasing cell division. To determine whether the increased proliferation induced by 24 h of CDPs treatment was due to the TOR pathway activation, PF-470867—a specific S6K inhibitor—was applied to the culture media (Pearce et al., 2010). PF-470867 at 0.16 µM reduced cellular division, and co-administration of this inhibitor with CDPs did not increase cell division as much as CDPs alone (Fig. 2b and c). All these data suggest that CDPs induced growth and development in *A. thaliana* in a TOR pathway activation-dependent manner by inducing cell proliferation.

3.3. Cyclodipeptides activate the TOR/S6K pathway

The increased cell division by CDPs required TOR pathway activation. To elucidate whether CDPs action was through the TOR pathway, *A. thaliana* *tor-es* (inducible estradiol-siRNA) seedlings, which were

incubated with estradiol 5 mM for 6 days, were transferred for an additional 9 days to a medium supplemented with the CDPs mix (0–100 µg/mL; Fig. 3). Our results shown that only the concentration of 10 µg/mL statistically increased fresh weight, and that none of the concentrations used of CDPs modified either the length of the main root or the number of lateral roots, indicating that the promoting effect and root changes observed by CDPs on plant growth required the TOR protein involvement (Fig. 3b).

We then evaluated the TOR pathway activation by analyzing the downstream S6K (S6K1) protein by protein gel blot analysis on protein extracts from plants treated with the CDPs mix at 0.1–100 µg/mL for 2 h (Fig. 4a). The results showed an increase in S6K phosphorylation in Thr-449 after 2 h of treatment and no significant changes in total S6K protein levels. Next, we selected the concentration of 1 µg/mL of CDPs to analyze S6K protein phosphorylation and total protein levels, and exposed plants for 30, 60, 90, and 120 min to this CDPs concentration (Fig. 4b). The time-course results indicated a peak of S6K phosphorylation at 90 min and a subsequent signal decrease at 120 min, with no

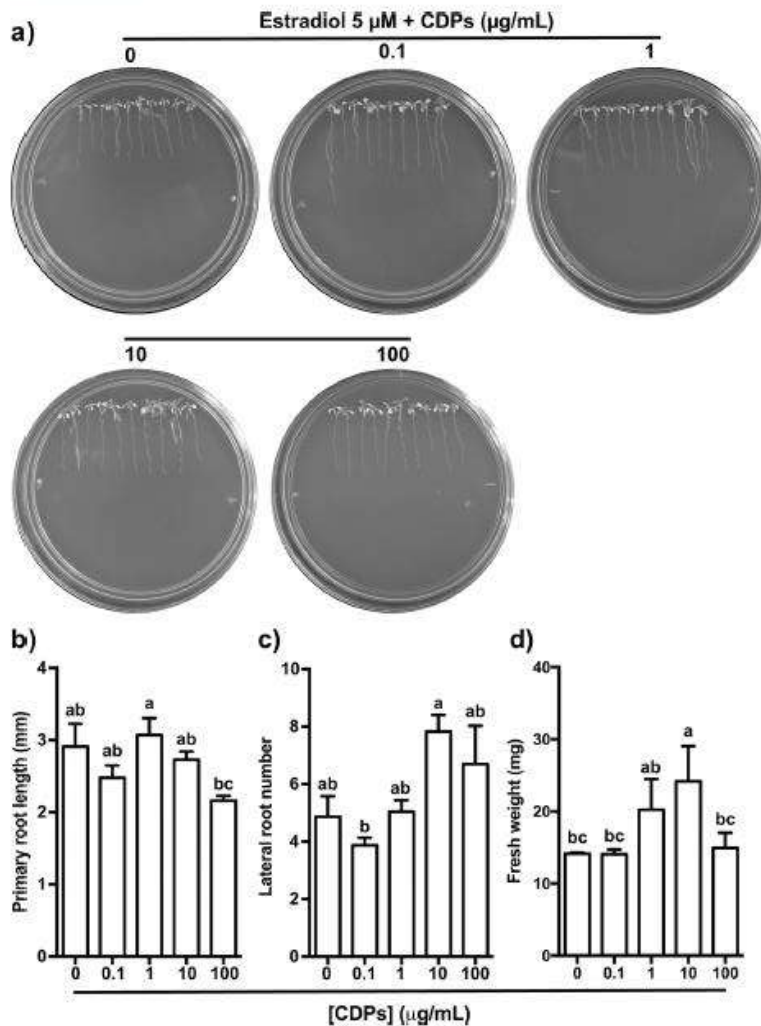


Fig. 3. Effect of cyclodipeptides (CDPs) on seedlings with decreased TOR expression. a) Representative photographs of root systems selected with 5 µM estradiol and transferred to a medium with 5 µM estradiol + 0, 1, or 100 µg/mL CDPs. Quantitative data of b) primary root length, c) lateral root number, and d) fresh weight. Data are presented as mean \pm SD (n = 10). Different letters represent statistically different means in a one-way ANOVA, with a post-hoc Tukey test ($P \leq 0.05$). The experiment was repeated twice, with similar results.

changes in S6K total protein levels. This shows a cyclic S6K phosphorylation and, therefore, suggests cyclic TOR activation. To corroborate that S6K phosphorylation induced by the CDP mix was dependent on TOR, we used increased AZD8055 concentrations (Fig. 4c), which reduced S6K phosphorylation levels. However, when plants were treated with AZD8055 1 µM plus CDPs 0–100 µg/mL, the inhibitor was not sufficient to decrease the S6K phosphorylation induced by CDPs addition (Fig. 4d).

3.4. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 induced electrophoretic shift of S6K protein

In the *Arabidopsis-Pseudomonas* plant interaction system, CDPs mediated plant growth promotion in an auxin-dependent manner (Ortiz-Castro et al., 2019). Here, we explored the connection between plant growth promotion induced by CDPs and the TOR pathway during the interaction. We used 6-day-old *A. thaliana* Col-0 seedlings

co-cultivated with *P. aeruginosa* Col-0 (WT) or JM2 ($\Delta lasI/\Delta rhII$) for 10 days (Fig. 5a, Supplementary Fig. 2). *P. aeruginosa* has two mainly *N*-acyl-L-homoserine lactone (AHL)-dependent quorum-sensing (QS) systems: the *las* and *rhl* systems. In the *las* system, the LasI AHL synthase directs the synthesis of 3-oxoC12-AHL, which interacts with the transcription factor LasR to target gene promoters. In the *rhl* system, the RhlI synthase directs the synthesis of C4-AHL, which interacts with the cognate regulator RhlR and controls transcription of target genes (Pearson et al., 1994; Pesci et al., 1997). It was shown that CDPs were accumulated in *P. aeruginosa* $\Delta lasI/\Delta rhII$ double mutant (JM2) extracts, suggesting that AHL signals modulate the production of compounds directly involved in plant growth promotion (Ortiz-Castro et al., 2011). Moreover, the production of virulence factors in *P. aeruginosa* is controlled according to cell density through both *las* and *rhl* QS systems; therefore, additionally to CDPs increase, the JM2 strain have reduced production of virulence factors (Pesci et al., 1997).

The co-inoculation with the bacterial strains showed an increase in

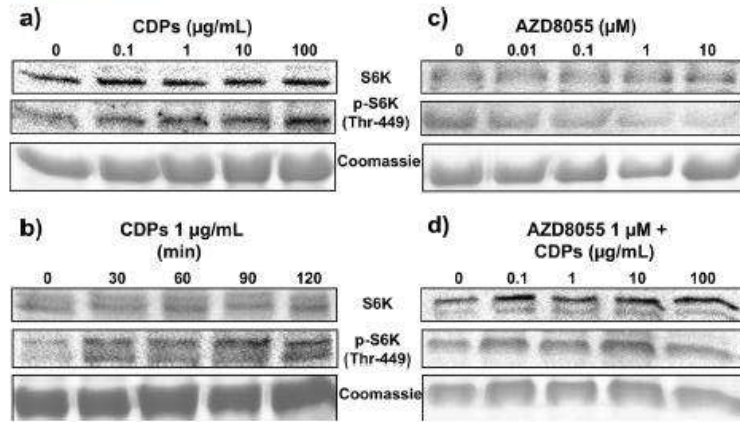


Fig. 4. Activation of S6K protein by cyclo-dipeptides (CDPs). Protein extracts from 6-day-old *A. thaliana* Col-0 seedlings treated with CDPs were resolved by SDS-PAGE and analyzed by protein gel blot hybridization using anti-AtS6K or anti-AtS6K-phosphorylated (Thr 449) antibodies. Treatment with a) 0, 0.1, 1, 10, and 100 µg/mL CDPs, b) 1 µg/mL CDPs for 0, 30, 60, 90 and 120 min, c) 0, 0.01, 0.1, 1 and 10 µM AZD8055 for 2 h, and d) 1 µM AZD8055 + 0, 0.1, 1, 10, and 100 µg/mL CDPs for 2 h in a growth chamber. The experiments were repeated twice, with similar results.

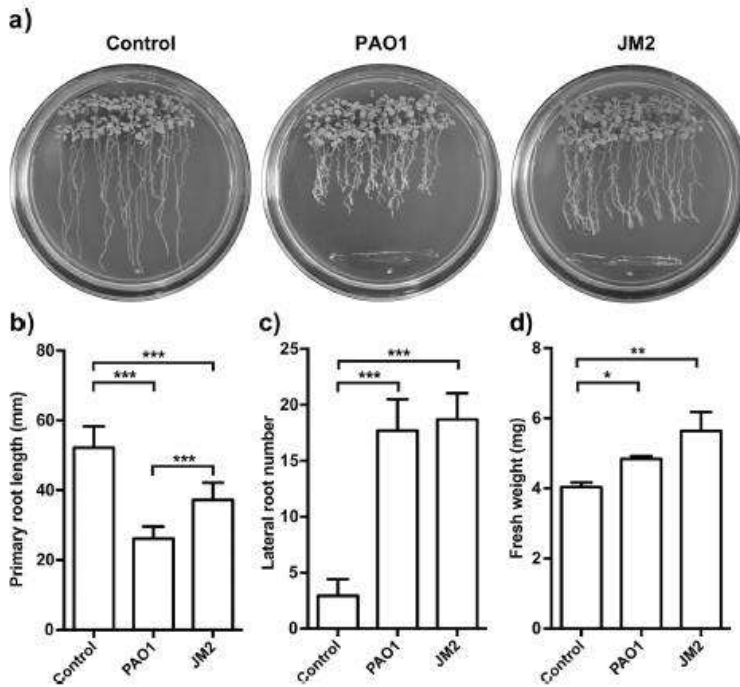


Fig. 5. Co-inoculation of *Arabidopsis thaliana* with *Pseudomonas aeruginosa* WT (PAO1) and JM2 ($\Delta lasI/\Delta rhII$). a) Representative photographs of 6-day-old seedlings inoculated with *P. aeruginosa* WT and JM2 at 5 cm from the root tip that were placed in a growth chamber for 10 days. Quantitative data of b) primary root length, c) lateral root number, and d) fresh weight. Data are presented as mean \pm SD ($n = 20$). One-way ANOVA, with a post-hoc Tukey test (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$) was performed. The experiment was repeated three times, with similar results.

lateral root number and fresh weight (Fig. 5c and d), as previously reported by Ortiz-Castro et al. (2011). These plants were used to prepare protein extracts, which were analyzed by two-dimensional PAGE (2-D) and protein gel blot analysis using the anti-S6K antibody (Fig. 6a and b). Changes in electrophoretic mobility and intensity of AtS6K spots were observed in the proteins from co-inoculated plants with *P. aeruginosa* PAO1 or JM2, compared with untreated plants. The spots detected by protein gel blot analysis were mobilized towards the positive pole, suggesting an increase in S6K phosphorylation and, therefore, TOR

activation, although other post-translational modifications could be possible. In addition, we demonstrated the relevance of TOR expression in *Arabidopsis-Pseudomonas* interaction. *Arabidopsis thaliana* Col-0, G548 (over-expressing TOR, OX-TOR) or tor-es seedlings were used and co-inoculated with *P. aeruginosa* PAO1 or JM2 strains at the front (1 cm) of the primary root tip (Fig. 7a, supplementary Fig. 3). An increased biomass in OX-TOR seedlings compared with Col-0 seedlings was observed with both strains (Fig. 7b). However, inoculation with JM2 or PAO1 strains did not induce morphological changes or increased

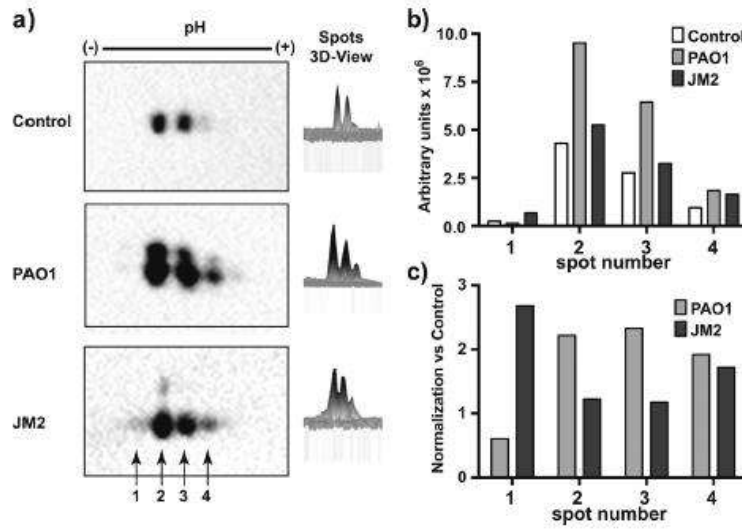


Fig. 6. Analysis of S6K protein from *Arabidopsis thaliana* Col-0 plants co-inoculated with *Pseudomonas aeruginosa* strains. a) Representative photographs of 2-D protein gel blot analysis of S6K isoforms (left) and the corresponding 3D view (right). b) Quantification of S6K spots in control plants and *P. aeruginosa* PAO1- or JM2-treated plants. c) Normalization of intensity spots from the S6K isoform. The experiment was repeated twice, with similar results. The spot numbers are indicated with arrows.

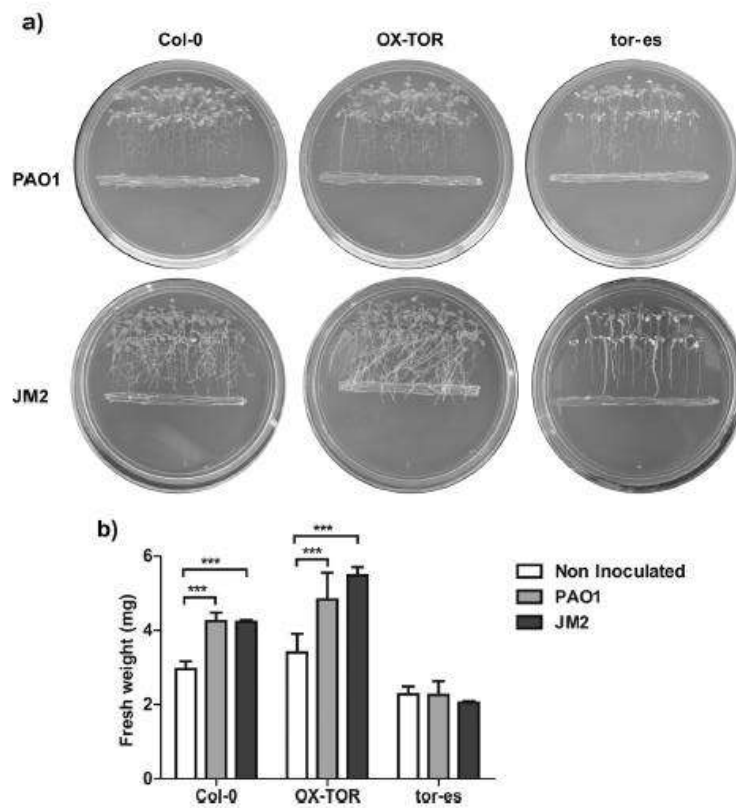


Fig. 7. Interaction of *Arabidopsis thaliana* lines with modified TOR expression and *Pseudomonas aeruginosa* strains. a) Representative photographs of 6-day-old seedlings (Col-0, OX-TOR, and those selected with 5 μM estradiol [tor-es]) inoculated with *P. aeruginosa* PAO1 or JM2 at the limit of the root tip and placed in a growth chamber for 10 days. b) Fresh weight data. Data is presented as mean ± SD (n = 20). One-way ANOVA, with a post-hoc Tukey test (***) P ≤ 0.001) was performed. The experiment was replicated twice, with similar results.

biomass production in tor-es seedlings, further indicating that TOR protein is involved in the plant growth-promoting effect of CDPs produced by the bacteria. Although both bacterial strains increased the biomass, it was observed that the roots of the plants that were growing with the PAO1 strain modified their growth when approaching the bacterial streak (Fig. 7a, Supplementary Fig. 3), suggesting that the virulence factors produced by the PAO1 strain are perceived by plants and redirect their growth.

4. Discussion

CDPs have attracted considerable attention because of their remarkable biological activity in plants. Using an *in vitro* interaction system, *P. aeruginosa* was shown to promote *A. thaliana* growth by producing CDPs (Ortiz-Castro et al., 2011). In the present study, a mix of CDPs was extracted from bacterial cell-free cultures, and their growth-promoting activity was evaluated (Fig. 1a) by determining the quantity of CDPs required to induce plant growth promotion. It was shown that the CDP mix induced growth and development at 0.1 and 10 µg/mL, whereas at higher concentrations of the CDP mix (100 µg/mL), *A. thaliana* growth of the primary root was repressed. This effect is largely reminiscent of the activation of an auxin signaling pathway in which primary root growth is repressed and lateral root formation and growth are induced, as previously suggested by Ortiz-Castro et al. (2011).

Induction of tissue growth could be due to an increase in cell proliferation and/or elongation. To investigate by which of these two processes CDPs induce plant growth, we evaluated *CYCBI* expression to evaluate proliferation using the reporter line *CycBI::uidA* (Colón-Carmona et al., 1999) (Fig. 2, Supplementary Fig. 1). The *CYCBI* protein is expressed around the G2/M cell cycle transition phase (Shaul et al., 1996), therefore it can be used as a reporter for cell division. It was observed that the exposure of the *A. thaliana* *CycBI::uidA* transgenic line to the CDP mix for 24 h increased reporter gene expression in a dose-dependent manner, indicating that cell proliferation is activated by CDPs. However, PF-470871, an S6K inhibitor, restored the cell division rate induced by CDPs when both compounds were added to the plant media. This observation indicated that CDPs were able to induce cell proliferation in *A. thaliana* roots, and that this effect involved an active TOR pathway. At eight days of exposure, CDP mix increased *CycBI::uidA* reporter gene expression in primary roots, except for 100 µg/mL (Supplementary Fig. 1a), which is consistent with the effect on primary root growth observed.

Additionally, it was found that the increase in lateral root number induced by the 10 µg/mL of CDPs treatment is due to the increased maturation of LRP (Supplementary Fig. 1b), and expression of *CYCBI* protein in lateral root primordia (Supplementary Fig. 1a). This indicates that root branching induced by this concentration of CDPs is due to an increase in cell proliferation in primary and lateral roots. Although there is no obvious effect in *CycBI* expression at 100 µg/mL of CDPs (Supplementary Fig. 1a, lower panel), a slight increase in the number of lateral roots was observed (Fig. 1c); this increase could be explained by the effect of this CDPs concentration in the lateral root primordia maturation observed (Supplementary Fig. 1b).

The TOR kinase is considered a master regulator of growth in eukaryotes. It functions as a sensor of cell conditions and can be activated by plant hormones such as auxins (Deng et al., 2016; Turck et al., 2004), in a pathway that involves the small GTPase ROP2 (Schepetilnikov and Ryabova, 2017). As mentioned above, CDPs possess auxin-like activity; therefore, we investigated whether CDPs were able to activate the TOR pathway. Previous reports indicate that TOR expression is not modified under growth inducer treatments but instead induced TOR pathway activation by phosphorylation (Beltrán-Peña et al., 2002; Schepetilnikov and Ryabova, 2017). For this reason, to correlate the effect of CDPs with the TOR pathway, plants with altered TOR expression (tor-es) were used and treated with 0–100 µg/mL of CDP mix added

to growth media (Fig. 3).

Cyclodipeptides induce reduced morphological changes in tor-es plants, conversely to what was previously observed in incubated WT plants (Fig. 1), indicating the relevance of TOR expression in plant growth induced by CDPs from *P. aeruginosa*. We also analyzed whether the CDP mix induced changes in the phosphorylation status of a TOR downstream target, the S6K protein. To this end, Col-0 plants were exposed to 0.1–100 µg/mL of CDPs for 2 h, with the aim of analyzing pathway activation (Fig. 4). Changes in electrophoretic mobility have been observed in p70S6K from Swiss 3T3 cells, depending on the phosphorylation status of the protein (Pearson et al., 1995). The activation of S6K proteins is brought about by multiple phosphorylation sites, and a set of key regulatory sites is perfectly conserved in the S6K1 protein from *Arabidopsis* (Turck et al., 2004). Only S6K1 has been extensively studied in this plant, and frequently has been ligated to S6K activity (Baksi et al., 2019; Deng et al., 2016; Turck et al., 2004).

It was observed that the CDP mix was able to increase the phosphorylation of S6K at all doses compared with control plants (Fig. 4a). Additionally, a time-course treatment was realized in plants using 1 µg/mL of CDP mix for 30, 60, 90, and 120 min (Fig. 4b), where a gradual S6K phosphorylation induction was observed, with a maximum at 90 min of treatment, and a decrease in phosphorylation at 120 min. Furthermore, with the inhibition of TOR with AZD8055 (Fig. 4c), as expected, a decrease in S6K phosphorylation was observed, and with the co-administration of AZD8055 and CDP mix, an increased phosphorylation of S6K was observed (Fig. 4d), suggesting that S6K phosphorylation was induced by CDPs through TOR activation. This is shown by different bands detected by the corresponding antibody (Fig. 4b and d). All these results indicated that CDPs were able to activate the TOR pathway in *A. thaliana* seedlings without changing S6K protein expression.

To further correlate the activation of the TOR pathway induced by CDPs with the growth and development promotion induced by these compounds, we used an interaction system in which *A. thaliana* seedlings were grown in the presence of *P. aeruginosa* PAO1 (wild-type) or JM2 ($\Delta lasI/\Delta rhII$) strains for 10 days (Fig. 5, Supplementary Fig. 2). Protein extracts from these plants were prepared and proteins were analyzed by 2-D electrophoresis and protein gel blot analysis to assess post-translational modifications of S6K (Fig. 6). It was observed that co-inoculation of *Arabidopsis* plants with *P. aeruginosa* PAO1 or JM2 induced changes in S6K electrophoretic mobility towards the positive pole (S6K has a theoretical isoelectric point of 6.3), indicating post-translational changes such as phosphorylation (or others affecting S6K Ip or Mw), thereby suggesting an increased S6K phosphorylation and TOR activation.

Similar shifts in S6K electrophoretic mobility due to protein phosphorylation have been observed during maize germination (Reyes de la Cruz et al., 2004). Both strains produced CDPs, but it has been reported that the JM2 mutant did not produce virulence factors amounts that could affect or interfere with the activation of S6K and, therefore, the growth-promoting effect induced by CDPs. Indeed, Corona-Sánchez et al. (2019) established a connection between CDPs, growth induction of maize plants, and S6K electrophoretic mobilization in a similar way (Corona-Sánchez et al., 2019). Finally, in this interaction system, using *A. thaliana* seedlings over- or down-expressed TOR (OX-TOR and tor-es, respectively) (Fig. 7, Supplementary Fig. 3), we observed that OX-TOR seedlings increased biomass production when inoculated with *P. aeruginosa* PAO1 or JM2 (Fig. 7b), compared with Col-0 seedlings, and tor-es did not show morphological or biomass changes following the inoculation. These results reinforce the TOR-dependence of growth and development induced by *P. aeruginosa*. Based on these results, we can conclude that CDPs produced by *P. aeruginosa* induce growth and development through activation of S6K and, therefore, by activation of the TOR pathway in *A. thaliana*.

5. Conclusions

Cyclodipeptides produced by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 induce primary root growth and promote lateral root development in a dose-dependent fashion in *Arabidopsis thaliana* through a mechanism that requires activation of the TOR/S6K pathway.

CRedit authorship contribution statement

Omar González-López: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Writing - original draft. **Brenda Berenice Palacios-Nava:** Conceptualization, Methodology, Investigation. **César Arturo Peña-Urbe:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Writing - original draft. **Jesús Campos-García:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **José López-Bucio:** Writing - review & editing. **Ernesto García-Pineda:** Writing - review & editing. **Homero Reyes de la Cruz:** Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors whose names are listed immediately below certify that they have NO affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest (such as honoraria; educational grants; participation in speakers' bureaus; membership, employment, consultancies, stock ownership, or other equity interest; and expert testimony or patent-licensing arrangements), or non-financial interest (such as personal or professional relationships, affiliations, knowledge or beliefs) in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-México, grants number 222405 and number 256119, and the Coordinación de la Investigación Científica-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CIC-UMSNH) program 2016-19. Omar González-López was the recipient of CONACYT fellowship, number 259020.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153343>.

References

Ahator, S.D., Zhang, L., 2019. Small is mighty—chemical communication systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Annu. Rev. Microbiol.* 73 (1), 559–578. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120044>.

Bakshi, A., Moia, M., Madhav, M.S., Kirti, P.B., 2019. Target of rapamycin, a master regulator of multiple signaling pathways and a potential candidate gene for crop improvement. *Plant Biol.* 21 (2), 190–205. <https://doi.org/10.1111/plb.12935>.

Beltrán-Peña, E., Aguilar, R., Ortiz-López, A., Dinkova, T.D., De Jiménez, E.S., 2002. Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation. *Physiol. Plant* 115 (2), 291–297. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2002.1150216.x>.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

Camu, N., Belin, P., Thai, R., Correia, I., Lequin, O., Seguin, J., Montiez, M., Gondry, M., 2018. Incorporation of non-canonical amino acids into 2,5-Diketopiperazines by cyclodipeptide synthases. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57 (12), 3118–3122. <https://doi.org/10.1002/anie.201712536>.

Colón-Carmona, A., Yoo, R., Haimovitch-Gal, T., Doerner, P., 1999. Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20 (4), 503–508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.1999.00620.x>.

Corona-Sánchez, L., Peña-Urbe, C.A., González-López, O., Villegas, J., Campos-García, J., Reyes de la Cruz, H., 2019. Cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* modulate the maize (*Zea mays* L.) root system and promote S6 ribosomal protein kinase activation. *PeerJ* 7, e7494. <https://doi.org/10.7717/peerj.7494>.

Deng, K., Yu, L., Zheng, X., Zhang, K., Wang, W., Dong, P., Zhang, J., Ren, M., 2016. Target of rapamycin is a key player for auxin signaling transduction in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00291>.

Deprost, D., Yao, L., Sorman, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C., Meyer, C., 2007. The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* 8 (9), 864–870. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401043>.

Dobrenel, T., Caldera, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincenz, M., Veit, B., Meyer, C., 2016. TOR signaling and nutrient sensing. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67 (1), 261–285. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-1146-48>.

González, J.E., Keshavan, N.D., 2006. Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70 (4), 859–875. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00002-06>.

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 synthetases from *Pseudomonas aeruginosa* play a role in cyclodipeptide biosynthesis, quorum-sensing regulation, and root development in a plant host. *Microb. Ecol.* 73 (3), 616–629. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0896-4>.

Hernández-Padilla, L., Vázquez-Rivera, D., Sánchez-Briones, L.A., Díaz-Pérez, A.L., Moreno-Rodríguez, J., Moreno-Eutimio, M.A., Meza-Carmen, V., Cruz, H.R.-Dl., Campos-García, J., 2017. The antiproliferative effect of cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on HeLa cells involves inhibition of phosphorylation of akt and S6k kinases. *Molecules* 22 (6), 1024. <https://doi.org/10.3390/molecules22061024>.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W., 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6 (13), 3901–3907. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02730.x>.

Jing, H., Strader, L.C., 2019. Interplay of auxin and cytokinin in lateral root development. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (3), 486. <https://doi.org/10.3390/ijms20030486>.

Malamy, J.E., Benfey, P.N., 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124 (1), 33–44. <https://dev.biologists.org/content/124/1/33>.

Mishra, A.K., Choi, J., Choi, S.-J., Baik, K.-H., 2017. Cyclodipeptides: an overview of their biosynthesis and biological activity. *Molecules* 22 (10), 1796. <https://doi.org/10.3390/molecules22101796>.

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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (17), 7253–7258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106740108>.

Ortiz-Castro, R., Campos-García, J., López-Bucio, J., 2019. *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* influence *Arabidopsis* root system architecture through an auxin response mediated by bioactive cyclodipeptides. *J. Plant Growth Regul.* <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09979-w>.

Pearce, Laura R., Alton, Gordon R., Richter, Daniel T., Kath, John C., Lingard, L., Chapman, J., Hwang, C., Alessi, Dario R., 2010. Characterization of PF-4708671, a novel and highly specific inhibitor of p70 ribosomal S6 kinase (S6K1). *Biochem. J.* 431 (2), 245–255. <https://doi.org/10.1042/bj20101024>.

Pearson, J.P., Gray, K.M., Passador, L., Tucker, K.D., Eberhard, A., Iglewski, B.H., Greenberg, E.P., 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1), 197–201. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.1.197>.

Pearson, R.B., Dennis, P.B., Han, J.W., Williamson, N.A., Kozma, S.C., Wettenhall, R.E., Thomas, G., 1995. The principal target of rapamycin-induced p70S6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *EMBO J.* 14 (21), 5279–5287. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00212.x>.

Pesd, E.C., Pearson, J.P., Seed, P.C., Iglewski, B.H., 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 179 (10), 3127–3132. <https://doi.org/10.1128/jb.179.10.3127-3132.1997>.

Potnikova, J.M., Rahme, L.G., Ausubel, F.M., 2000. Pathogenesis of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 124 (4), 1766–1774. <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1766>.

Rahme, L., Stevens, E., Wolford, S., Shao, J., Tompkins, R., Ausubel, F., 1996. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268 (5219), 1899–1902. <https://doi.org/10.1126/science.7604262>.

Rezin, D., Meyer, C., Robaglia, C., Veit, B., 2015. TOR signalling in plants. *Biochem. J.* 470 (1), 1–14. <https://doi.org/10.1042/bj20150505>.

Reyes de la Cruz, H., Aguilar, R., Sánchez de Jiménez, E., 2004. Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70S6K. *Biochemistry* 43 (2), 533–539. <https://doi.org/10.1021/bk035222z>.

Schepetilnikov, M., Ryabova, L.A., 2017. Auxin signaling in regulation of plant translation reinitiation. *Front. Plant Sci.* 8 (1014). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01014>.

Shaul, O., Mironov, V., Bursens, S., Van Montagu, M., Inze, D., 1996. Two *Arabidopsis* cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation in synchronized tobacco BY-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (10), 4868–4872. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4868>.

Turck, F., Zilbermann, F., Kozma, S.C., Thomas, G., Nagy, F., 2004. Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134 (4), 1527–1535. <https://doi.org/10.1104/pp.103.035873>.

Xiong, Y., McCormack, M., Li, L., Hall, Q., Xiong, C., Sheen, J., 2013. Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496 (7444), 181–186. <https://doi.org/10.1038/nature12030>.



Cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* modulate the maize (*Zea mays* L.) root system and promote S6 ribosomal protein kinase activation

Iván Corona-Sánchez¹, Cesar Arturo Peña-Uribe¹, Omar González-López^{1,2}, Javier Villegas³, Jesus Campos-García² and Homero Reyes de la Cruz¹

¹ Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

² Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

³ Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Laboratorio de Agroecología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México

ABSTRACT

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic and pathogenic bacterium with the ability to produce cyclodipeptides (CDPs), which belong to a large family of molecules with important biological activities. Excessive amounts of CDPs produced by *Pseudomonas* strains can activate an auxin response in *Arabidopsis thaliana* and promote plant growth. Target of rapamycin (TOR) is an evolutionarily conserved eukaryotic protein kinase that coordinates cell growth and metabolic processes in response to environmental and nutritional signals. Target of rapamycin kinase phosphorylates various substrates, of which S6 ribosomal protein kinase (S6K) is particularly well known. The PI3K/Akt/mTOR/S6K signaling pathway has been studied extensively in mammals because of its association with fundamental biological processes including cell differentiation. However, evidences suggest that this pathway also has specific and conserved functions in plants and may thus be conserved, as are several of its components like TOR complex 1 and S6K proteins. In plants, TOR-S6K signaling has been shown to be modulated in response to plant growth promoters or stressors.

Methods: In this study, we evaluated the effects of *P. aeruginosa* CDPs on the growth and root development of maize plants (*Zea mays* L.) by adding different CDPs concentrations on culture plant media, as well as the effect on the phosphorylation of the maize S6K protein (*ZmS6K*) by protein electrophoresis and western blot.

Results: Our results showed that *P. aeruginosa* CDPs promoted maize growth and development, including modifications in the root system architecture, correlating with the increased *ZmS6K* phosphorylation and changes induced in electrophoretic mobility, suggesting post-translational modifications on *ZmS6K*. These findings suggest that the plant growth-promoting effect of the *Pseudomonas* genus, associated with the CDPs production, involves the TOR/S6K signaling pathway as a mechanism of plant growth and root development in plant-microorganism interaction.

Submitted 10 April 2019
Accepted 16 July 2019
Published 28 August 2019

Corresponding author
Homero Reyes de la Cruz,
delacruz@umich.mx

Academic editor
Gerard Lazo

Additional Information and
Declarations can be found on
page 13

DOI 10.7717/peerj.7494

© Copyright
2019 Corona-Sánchez et al.

Distributed under
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

Subjects Agricultural Science, Biochemistry, Biotechnology, Cell Biology, Molecular Biology

Keywords Plant growth, Cyclodipeptides, TOR-S6K pathway, Root system

INTRODUCTION

Living organisms can typically adjust their metabolism in response to resource availability in their environment. Favorable environmental stimuli (availability of nutrients, energy, or growth factors) promote anabolic processes in cells, which leads to an increase in size and biomass. In contrast, exposure to stressors such as nutrient or energy deficits, hypoxia, or DNA damage leads to the downregulation of macromolecule synthesis and upregulation of catabolic processes like autophagy (Wulfschleger, Loewith & Hall, 2006).

Inoculation of *Arabidopsis thaliana* plants with a *Pseudomonas aeruginosa lasI/rhlI* double mutant strain substantially increased shoot and root biomass production. This mutant strain lacks both *lasI* and *rhlI* genes, therefore is unable to produce N-acyl-L-homoserine lactones, which are *quorum sensing* molecules that regulate virulence factors production. The compounds responsible for this increase in plant growth were identified as cyclic dipeptides (cyclodipeptides (CDPs)): cyclo(L-Pro-L-Tyr), cyclo(L-Pro-L-Val), and cyclo(L-Pro-L-Phe), which also activated the auxin-inducible DR5:*uidA* marker in transgenic *Arabidopsis* plants (Ortiz-Castro et al., 2011). Cyclodipeptides are non-ribosomal peptides synthesized by a large number of organisms and constitute a novel family of heterocyclic compounds with different important biological activities (Belin et al., 2012; Hernández-Padilla et al., 2017). Cyclodipeptides have been shown to affect plant development by eliciting various responses including growth promotion (Cronan et al., 1998; Degross et al., 2002; Kimura et al., 2005), germination and hydric stress resistance (Ienaga et al., 1990), expression of pathogen resistance genes (Park et al., 2016), and promotion of lateral root formation (Ortiz-Castro et al., 2011; González et al., 2017; Ortiz-Castro, Campos-García & López-Bucio, 2019).

Target of Rapamycin (TOR) protein kinase is a key cell growth regulator in eukaryotes and it is important for cell growth control and metabolic responses to environmental signals. The genomes of most examined eukaryotes contain a single copy of the TOR gene and knockout studies indicate that the mutation of this gene is lethal, inducing developmental arrest at an early stage (Menand et al., 2002; Gangloff et al., 2004; Xiong et al., 2016). In mammals, TOR forms part of two complexes referred to as mTORC1 and mTORC2 that differ in functions, subunit composition, and susceptibility to rapamycin, an antifungal macrolide with strong immunosuppressive and antiproliferative properties (Vézina, Kudelski & Sehgal, 1975; Martel, Klicius & Galet, 1977; Eng, Sehga & Vézina, 1984). The mTORC2 complex (comprising the TOR, RICTOR, and mLST8 subunits) is not inhibited by rapamycin and its function is associated mainly with actin cytoskeleton polarization and endocytosis (Kamada et al., 2005; Niles & Powers, 2014; Rispal et al., 2015). In contrast, the mTORC1 complex is susceptible to rapamycin inhibition and forms part of a signaling pathway that upregulates anabolic processes and suppresses catabolic processes when the environmental conditions are favorable for growth.

The mTORC1 complex regulates cell growth in response to four main factors: insulin, insulin-like growth factors (IGF), nutrients, energy levels, and stressors (e.g., lack of

nutrients or energy, hypoxia, or DNA damage). Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein (4EBP) and the S6 protein kinase (S6K), which phosphorylates the S6 ribosomal protein (a component of the small ribosomal subunit) were the first metazoan targets of mTORC1 to be identified (Meyuhas & Drazan, 2009; Fenton & Gout, 2011). Activation of S6K by mTOR is essential for overall protein synthesis efficiency and cell size control (Meyuhas, 2015) and modulates transcription, lipid synthesis, cell growth and size, and cellular metabolism (Magnuson, Ekim & Fingar, 2012). Compared to animals and yeasts, TOR signaling has not been extensively studied in plants; however, conserved components of this signaling pathway have been identified in plants and were found to exert functions similar to those of their mammals and yeasts counterparts (Dobrenel et al., 2016a; Schepetilnikov & Ryabova, 2018; Bakshi et al., 2019).

In maize, the presence of TOR-S6K signaling pathway components has been confirmed, including a TOR kinase protein (*ZmTOR*) (Agredano-Moreno et al., 2007), an insulin-like growth factor (*ZmIGF*) (García Flores et al., 2001), and an S6K protein kinase (*ZmS6K*) ortholog of the human p70S6K isoform (Reyes de la Cruz, Aguilar & Sánchez de Jiménez, 2004). Maize S6K comprises two of the main target residues that are essential for p70S6K activation in animals, namely Thr-229 (Ser-308 in *ZmS6K*) and Thr-389 (Thr-468 in *ZmS6K*), which is phosphorylated by TOR kinase and is critical for S6K activation (Wüllschlegel, Loewith & Hall, 2006).

In plants, TOR signaling has been shown to be activated by auxins and exposure to light, as well as glucose and amino acids, likely because a TOR signaling pathway evolved in plants as a consequence of sedentariness and photo-autotrophy (Dobrenel et al., 2016b; Schepetilnikov & Ryabova, 2018; Bakshi et al., 2019). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 CDPs can modulate several aspects of *A. thaliana* development (Ortiz-Castro et al., 2011; González et al., 2017); thus, in the present study, we assessed the effects of CDPs on growth and development of maize plants (*Zea mays* L.). Furthermore, we examined whether CDPs treatment induces the activation of the TOR signaling pathway through stimulation of S6K kinase phosphorylation.

MATERIALS AND METHODS

Plants and growth conditions

Zea mays L. 'Chalqueño' seeds were used in all the experiments. The seeds were surface-sterilized using 50% (v/v) sodium hypochlorite (NaClO, 6% active Cl) for 5 min and washed three times with deionized water. The seeds were then treated with 70% (v/v) ethanol for 5 min and again washed three times with deionized water. After this, the seeds were placed in cotton beds soaked with sterile water for germination (72 h, 25 ± 2 °C, in darkness). Seedlings that showed homogeneous growth were selected, and the endosperm was removed using a scalpel. Seedlings were surface-sterilized with sodium hypochlorite and ethanol, as detailed above, and placed in 25 × 150 mm tubes containing five mL of liquid MS medium (Murashige & Skoog, 1962) according to Martínez-de la Cruz et al. (2015). Solutions containing CDPs at different concentrations (0.5, 1, 10, 20, and 50 μM) or 12 μM indole-3-acetic acid (IAA) were added to the tubes. The highest amount of DMSO used for preparing the different concentration of CDPs was used for control

treatments (1.5 μ L DMSO/mL of medium) because CDPs stock was prepared in 80% DMSO. The tubes were placed in a plants growth chamber with a photoperiod of 16 h light and 8 h darkness at 22 ± 2 °C for 8 days. After this, plant growth was assessed by recording the shoot length, primary root length, number of lateral roots on the primary root, number of seminal roots, and number of crown roots.

To evaluate the effect of CDPs on maize plants, maize seeds were surface-sterilized as outlined above and germinated for 24 h. Seeds with homogeneous germination were selected, placed in pots with sterilized soil, and grown for 30 days. The seedlings were irrigated every third day. The control group received sterilized water, and the CDPs treatment group received sterile water containing CDPs at a concentration of 20 μ M. The *P. aeruginosa* CDPs mixture used in the different treatments were obtained as described by [Ortiz-Castro et al. \(2011\)](#) and [González et al. \(2017\)](#).

Plant growth analyses

The foliar and primary root lengths of plants were measured using a ruler. The numbers of lateral roots on primary, seminal, and crown roots were counted manually, and total root length, number of lateral roots, average root diameter, root volume, and surface area were recorded by automated scanning using an Epson Expression 11000XL A3 flatbed photo scanner and WhinRHIZO root imaging software (Regent Instruments Inc., Chemin Sainte-Foy, Quebec, Canada). Quantitative data were analyzed with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). A one-way ANOVA was performed followed by a Dunnett's *post-hoc* test and a Student's *t*-test for independent samples. The results are expressed as the arithmetic means \pm standard error.

Protein extraction

Embryonic axes from seeds germinated for 22 h were dissected and incubated in flasks containing either MS medium only or MS medium supplemented with CDPs at concentrations of 0.5, 1, 10, 20, or 50 μ M, or with 12 μ M IAA. The flasks were kept with slight agitation (120 rpm) for 2 h, and the embryonic axes were subsequently frozen using liquid nitrogen and then ground using a mortar. After this, an extraction buffer (50 mM HEPES, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium molybdate, 1 mM EDTA, 1 mM benzamidine, 20 mM NaF, 80 mM beta-sodium glycerophosphate, 0.2 mM PMSF, and 2 mM DTT at pH 7.6) was added to the sample powder and the mixture was centrifuged at $9,000 \times g$ at 4 °C for 30 min. The protein content was determined on supernatants by the Bradford method ([Bradford, 1976](#)).

Protein gel blot analyses

Protein extract samples (30 μ g) were separated by SDS-PAGE (12% acrylamide) and blotted on PVDF membranes (Millipore, Burlington, MA, USA). The membranes were incubated with either an anti-human-phospho-p70S6K-Thr389 (p-p70S6K) polyclonal antibody (1:1,000 dilution) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), or with an anti-ZmS6K polyclonal antibody (1:1,000 dilution) (Abbotec, San Diego, CA, USA) at 4 °C overnight. Membranes were washed with 0.15 M TBST for 10 min, then with 1 M TBST for

10 min, and then twice with 0.15 M TBST for 10 min. After this, the membranes were incubated for 2 h with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:3,000 dilution) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) at room temperature. The membranes were washed five times with 0.15 M TBST for 5 min each. The peroxidase reaction was revealed using luminol and detected using a ChemiDoc™ XRS+ system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Densitometry analysis for each protein blot was performed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MA, USA).

2D gel blot

For 2D gel blot assays, the 8-day-old maize plants were dissected in two parts: root and shoot, of which only the root was used because obvious changes were observed in this area by CDPs treatment. Tissues were ground with liquid nitrogen and the powder placed in extraction buffer (50% phenol [v/v], 0.9 M sucrose, 10 mM EDTA, 0.4% 2-mercaptoethanol [v/v], 100 mM Tris) with an equal part of phenol solution (equilibrated with 10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1mM EDTA), homogenized in vortex and centrifuged at 9,000×g at 4 °C for 10 min. The organic phase was recovered and an equal amount of extraction buffer was added. The sample was homogenized and centrifuged at 9,000×g at 4 °C for 10 min. The organic phase was recovered again and a precipitation solution (ammonium acetate/methanol) was added to precipitate the proteins at -20 °C overnight. After this period, the sample was centrifuged at 9,000×g at 4 °C for 10 min, and the precipitate washed three times with precipitation solution and final wash with cold acetone at 80%, performing a centrifugation at 9,000×g at 4 °C for 5 min between washes. The pellet was dissolved in isoelectric focusing buffer IEF (8M urea, 4% CHAPS, 7mM DTT, 2% ampholytes) and proteins were quantified by the Bradford method. Each protein sample (150 µg) was placed in 13 cm strips with an immobilized pH gradient of 3–10 (IPG DryStrip pH 3-10 NL, 13 cm; GE Healthcare Life Sciences). The strips were left to hydrate with the samples overnight. First dimension separation of proteins was performed with “Ettan IPGphor 3 Isoelectric Focusing Unit”. Subsequently, the strips were placed in 12% acrylamide gels for SDS–PAGE. Then, the gels were blotted on PVDF membranes (Millipore). Membranes were incubated with anti-ZmS6K (1:1,000 dilution), peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:3,000 dilution) and revealed as described above.

RESULTS

Modification of maize growth and development by *P. aeruginosa* CDPs

To evaluate the effect of CDPs on maize growth and development, we performed experiments using the *in vitro* system described in [Martínez-de la Cruz et al. \(2015\)](#), except that in the step of growing embryonic axes of 24 h in agar-solidified MS medium and cultured for 7 days, in this work the seeds were allowed to germinate 72 h and the seedlings were surface disinfected and placed in liquid MS media supplemented with CDPs or IAA as described in the “Materials and Methods” section. It was previously shown that 12 µM of IAA modify the maize root development ([Martínez-de la Cruz et al., 2015](#)).

Maize seedlings treated with *P. aeruginosa* CDPs for 8 days showed no significant changes in shoot growth at any treatment concentration compared to both the control and

the 12 μM IAA-treated seedlings (Fig. 1). Shoot growth (shoot length and primary root length) was not significantly different between plants treated with CDPs or IAA and the controls (Figs. 2A and 2B). In contrast, 20 μM CDPs treatment elicited a substantial increase in root system development compared to the other CDPs concentrations, IAA treatment, or control. The 20 μM CDPs and 12 μM IAA treatments led to a significant increase in the number of lateral roots (Fig. 2C). Moreover, there was a significant increase in the number of seminal roots, but not crown roots, in 20 μM CDP-treated versus control plants (Figs. 2D and 2E, respectively).

The effect of CDPs on maize plants was assessed over longer exposure periods to determine whether the previously observed effects would also occur at more advanced developmental stages. For this, maize plants were grown for 30 days in pots and treated with 20 μM CDPs based on the results obtained previously with the 8-days treatment. After 30 days, the treated maize plants showed increased growth and development, evidenced by increased shoot length and root biomass as showed at 20 μM CDPs treatment (Fig. 3). All the parameters showed increasing trends in CDPs-treated plants (Fig. 4, except for root diameter); however, only the differences in shoot length (Fig. 4A), total root length (Fig. 4B), lateral roots number (Fig. 4C), root volume (Fig. 4E), and root surface area (Fig. 4F) showed significant statistical differences compared to the controls, whereas the differences in root diameter, where a slight decrease was observed, were not significant (Fig. 4D). These results indicate that at advanced plant development stages, the CDPs significantly induces shoot and root development.

Effect of *P. aeruginosa* CDPs on S6K activation

The TOR kinase signaling pathway has been implicated in regulating growth and development in photo-synthetic and non-photosynthetic eukaryotes. To assess the association of the TOR pathway with the promotion of plant growth in CDPs-treated maize plants, protein gel blot analyses were performed using antibodies against anti-human p70-S6K phosphorylated at Thr389 (p-p70S6K), which is phosphorylated by TOR kinase and is critical for S6K activation. The results showed that CDPs treatment elicited a dose-dependent increase in *ZmS6K* phosphorylation (Fig. 5A), with the highest *ZmS6K* phosphorylation level occurring with 20 μM CDPs treatment, exceeding that of the 12 μM IAA treatment (Fig. 5B). Immunodetection with an antibody against *ZmS6K* showed that protein concentrations were not modified by either CDPs or IAA treatments (Fig. 5A). To further evaluate the effect of CDPs on *ZmS6K* activation, a 2D-PAGE protein gel blot analysis was performed using antibodies against *ZmS6K*. In our experimental conditions, two protein spots were detected at the molecular weight and pH range, corresponding to the *ZmS6K* protein. The results showed that there were changes in *ZmS6K* protein electrophoretic mobility in protein extracts from CDPs-treated plants; these changes could be observed as a displacement of protein spots towards more acidic pH (Fig. 6), indicating the appearance of *ZmS6K* isoforms with post-translational modifications, correlating with the increased levels of *ZmS6K* phosphorylation observed.

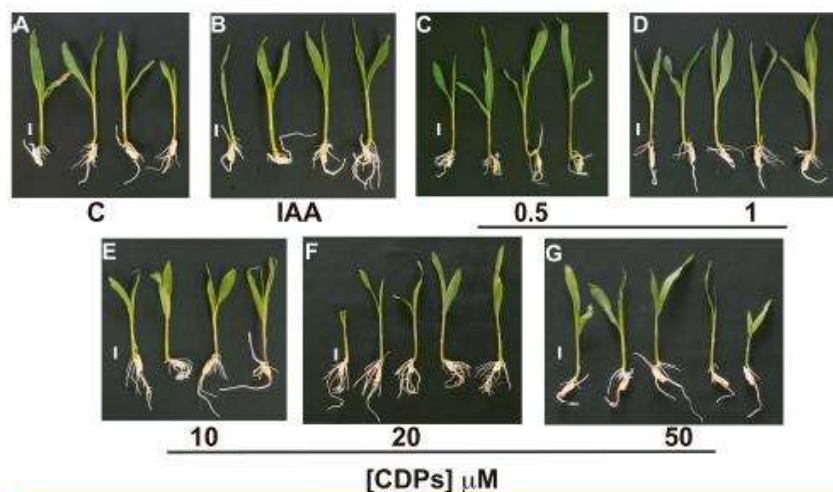


Figure 1 Effect of cyclodipeptides (CDPs) on maize seedling growth. Maize seedlings removed from seeds that germinated after 72 h were grown for 8 days in liquid MS medium. Control plants (A) and plants treated with 12 μM IAA (B) or CDPs at the indicated concentrations (C–G) are shown. Each group contained at least eight plants, and the experiments were repeated three times with similar results. Scale bar, one cm. Full-size [DOI: 10.7717/peerj.7494/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.7494/fig-1)

DISCUSSION

We assessed the plant growth-promoting effects of CDPs produced by the *P. aeruginosa* PAO1 strain on maize plants. Maize plants treated with 20 μM CDPs for 8 days elicited a significant increase in lateral and seminal root formation (Figs. 1 and 2). As CDPs treatment significantly affected root development, but not shoot growth, the treatment period was extended to examine the effect of CDPs on the long-term growth and development of maize plants. Plants treated with CDPs (20 μM) for 30 days showed a slight increase in shoot growth (Figs. 3A and 4A) in addition to a significant increase in the number of lateral roots, root volume, and root surface (Figs. 3C, 4C, 4E, and 4F, respectively). These effects may have been due to the key role of this root type in early maize development since lateral roots provide stability and increase the soil contact and absorption area (Grzesiak, 2009).

Although the specific mechanism by which CDPs promote plant growth remain unknown, a mimicking of auxin signals was suggested and is supported by computational molecular docking analysis (Ortiz-Castro et al., 2011). This study indicated that CDPs molecules may fit in the *A. thaliana* auxin receptor binding pocket in a manner similar to the natural hormone IAA, although with different affinities, as observed for 1-naphthaleneacetic acid (NAA) and 2,4-dichloro-phenoxyacetic acid (Ortiz-Castro et al., 2011).

The promoting effect of CDPs on lateral roots is likely due to an auxinic response. Auxins are essential for lateral root formation in maize, as shown in studies using chemical auxin-transport inhibitors (Jansen et al., 2012). Moreover, it was shown that the highest

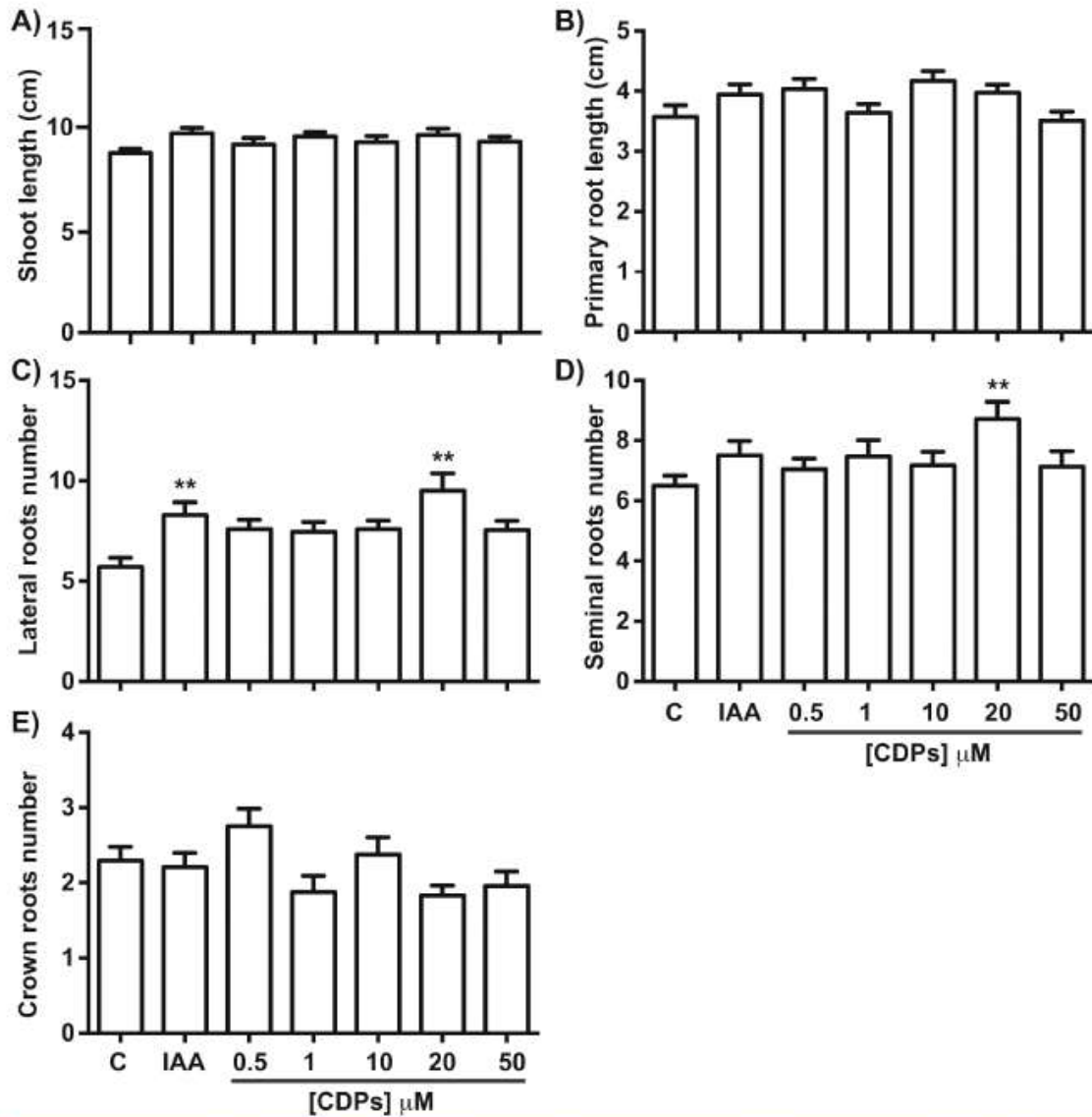


Figure 2 Quantitative effect of cydodipeptides (CDPs) on maize seedlings. Measurements of different parameters in the plants shown in Fig. 1: (A) shoot length; (B) primary root length; (C) lateral root number of primary roots; (D) seminal root number; and (E) crown root number. The asterisks indicate statistically significant differences compared to the control treatment. Bars indicate means \pm standard error ($n = 24$) from three independent experiments. One-way ANOVA, Dunnett's *post-hoc* multiple comparison test (**, $P < 0.01$).

Full-size DOI: [10.7717/peerj.7494/fig-2](https://doi.org/10.7717/peerj.7494/fig-2)

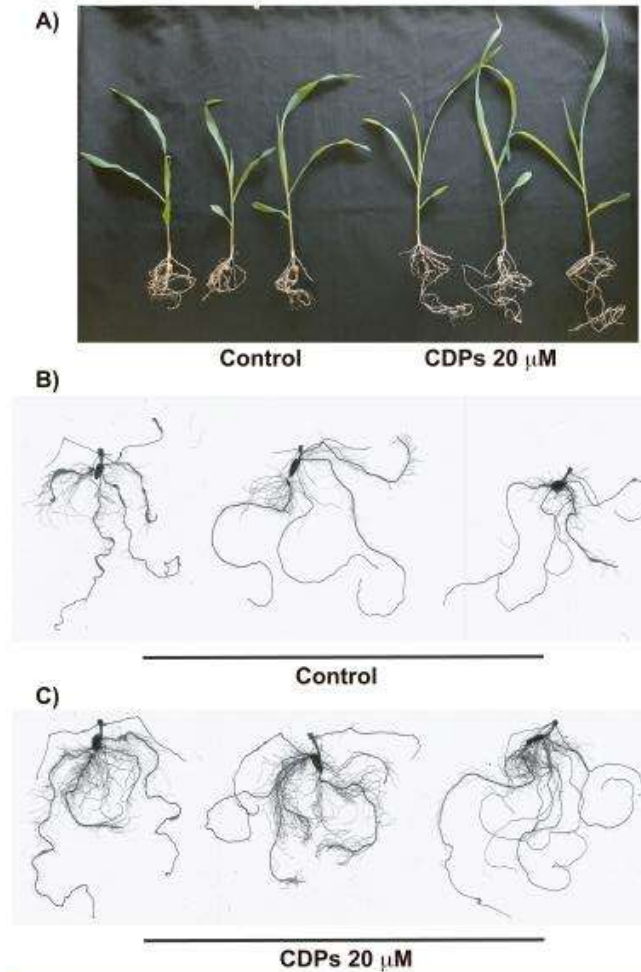


Figure 3 Effect of cyclodipeptides (CDPs) on maize plants after 30 days. The images show treated and control plants. (A) Representative plants for each treatment. (B) Representative root system images of control and (C) CDPs-treated plants. Full-size [DOI: 10.7717/peerj.7494/fig-3](https://doi.org/10.7717/peerj.7494/fig-3)

auxin concentrations occur in the phloem, where auxin is crucial for lateral root formation; auxin deficit results in random divisions of pericycle and endodermis cells, which hamper the formation of new organs (Jansen *et al.*, 2012).

Lateral roots are crucial for maize plant development within the first 2 weeks of growth. In this stage, lateral roots are the main sites of water absorption from the soil, whereas primary and seminal roots are responsible for water transport to the shoot (Ahmed *et al.*, 2016).

The CDPs treatment induces notable root development on maize plants; however, at a concentration of 20 μM, CDPs treatment elicited statistically significant effects on maize

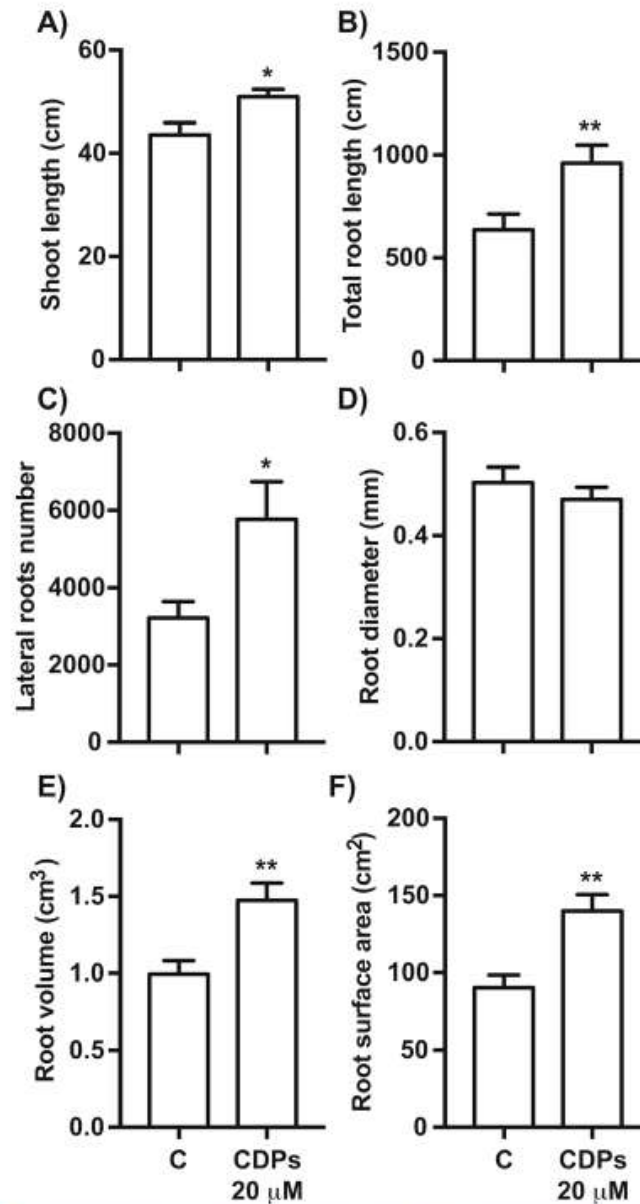


Figure 4 Quantitative effect of cyclodipeptides (CDPs) on 30-day-old maize plants. Measurements of morphological parameters in the plants shown in Fig. 3: (A) shoot length; (B) total root length; (C) lateral root number; (D) average root diameter; (E) root volume; and (F) root surface area. Asterisks indicate significant statistical differences compared to the control. Bars indicate means \pm standard error of three experiments. Unpaired *t*-test (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). Full-size [DOI: 10.7717/peerj.7494/fig-4](https://doi.org/10.7717/peerj.7494/fig-4)

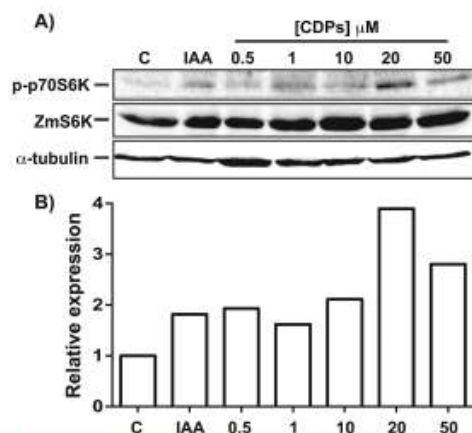


Figure 5 Effect of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI cyclodipeptides (CDPs) on the phosphorylation of maize S6K. Protein extracts from maize plants treated with 20 μ M CDPs were separated by SDS-PAGE and analyzed by protein gel blot using the following antibodies: (A) anti-human p-p70S6K; anti-ZmS6K; and anti-human α -tubulin. The experiment was repeated twice with similar results; representative images are shown. (B) Densitometric analysis of representative membranes using anti-human p-p70S6K and anti-ZmS6K antibodies and normalized to α -tubulin detection.

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.7494/fig-5](https://doi.org/10.7717/peerj.7494/fig-5)

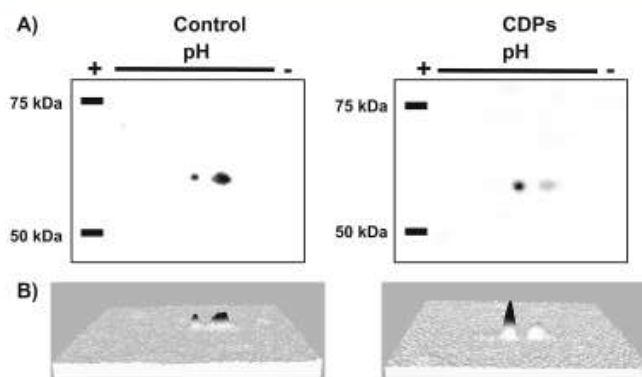


Figure 6 Effect of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI cyclodipeptide (CDP) treatment on ZmS6K electrophoretic mobility. The images show ZmS6K immunodetection by 2D-PAGE and protein gel blot analysis. (A) Shows representative images of immunodetected proteins from control and CDP-treated (20 μ M) plants using an anti-ZmS6K antibody and detected with the ChemiDocTM XRS+ system. (B) Shows 3D views of the images in (A) converted with Image LabTM software (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Protein standards, molecular mass in kDa, and the pH gradient are indicated. The experiment was repeated twice with similar results.

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.7494/fig-6](https://doi.org/10.7717/peerj.7494/fig-6)

root architecture, which may have been due to a lower affinity of CDPs compared to auxins such as indole-butyric acid (IBA) and NAA, which exert effects at lower concentrations. Treatment of maize plants with various auxins has been shown to exert different dose-dependent effects on root architecture. At concentrations ranging from 1.5 to 3 μ M,

IBA and NAA promoted lateral root formation and led to shortened primary roots, a phenotype associated with high concentrations of auxins; moreover, at concentrations ranging from 6 to 24 μM , IAA was shown to induce clear changes in root architecture (Martínez-de la Cruz et al., 2015).

As in lateral roots, the effects of CDPs on maize seminal root initiation may be due to an auxinic activity (Figs. 2–4). Seminal and lateral root numbers are determined by intrinsic developmental programs; however, previous studies indicated that initiation of seminal root formation was affected by several factors such as nutrient levels (i.e., growth in media with high or low phosphorus concentrations) (Zhu et al., 2006) and the effects of auxin-induced genes (Taramino et al., 2007).

Crown root formation was not significantly affected by CDPs treatment; however, it would be interesting to examine potential CDPs effects on adult plants with root systems dominated by crown roots.

Target of rapamycin kinase is the master regulator of cellular development by orchestrating nutrition/energy status with growth-induced signals. Studies on plants and mammals indicate that TOR only mediates the phosphorylation of RPS6 via S6K, which impact on the overall protein synthesis. S6 protein kinase phosphorylation at Thr388/389 is conserved both in animals and plants and is a widely used method for determining TOR activity (Xiong & Sheen, 2012; Schepetilnikov et al., 2013; Ahn, Ahn & Pai, 2014).

Regarding the effect of CDPs on ZmS6K phosphorylation, the highest level of phosphorylation was observed at a CDPs concentration of 20 μM (Fig. 5). Interestingly, a stronger activation of ZmS6K was observed in the 20 μM CDPs treatment group than in the other groups, in agreement with the overall results for growth and development. Furthermore, ZmS6K phosphorylation levels decreased with 50 μM CDPs treatment, suggesting an inhibitory effect at higher CDPs concentrations; however, no toxic effects were observed in the treated plants.

In agreement with the previous results, the 2D-PAGE protein gel blot analysis showed that 20 μM of CDPs treatment induced changes in ZmS6K electrophoretic mobility (Fig. 6). The changes may have resulted from post-translational modifications to which S6K is susceptible, mainly the addition of phosphate groups at multiple sites for complete S6K activation (Fenton & Gout, 2011). These results correlate with the increase in ZmS6K Thr-389 phosphorylation (Fig. 5), as well as the growth-promoting effect observed in maize plants treated with 20 μM CDPs for 8 and 30 days, suggesting an association between TOR kinase-mediated ZmS6K activation and the maize growth-promoting effects of the bacterial CDPs.

CONCLUSIONS

The role of the TOR/S6K signaling pathway as the central regulator of cell growth and development in eukaryotes has been established since the past decade. Conservation of the TORC1 complex and up and downstream components have been revealed in plants, and currently there is a growing interest in the plant scientific community to clarify the steps of the signaling pathway involved in plant adaptation processes regulated by it, to control plant growth and development. On the other hand, biotechnological strategies for

the development of products that increase the production of crops have been implemented, leading to the characterization of rhizospheric microorganisms, also as compounds produced by these microorganisms with plant growth promotion properties. *P. aeruginosa* is a ubiquitous bacterium that can be found colonizing plant roots causing pathogenesis; however, in our workgroup compounds able to improve the development of *A. thaliana* has been isolated from this bacterium, thus we now tested whether these compounds (CDPs) can have the same plant growth-promoting effect on maize, a cereal with economic interest worldwide. Our results showed that *P. aeruginosa* CDPs promote maize plant growth and development by modulating the root system architecture. The CDPs-induced promotion of growth and development in maize plants was correlated with increased levels of ZmS6K phosphorylation, suggesting the involvement of the TOR-S6K signaling pathway in the plant promoting effects of CDPs. This is the first study to show that plant-microorganism interaction phenomena mediated by organic molecules such as CDPs produced by members of the genus *Pseudomonas* involves the TOR/S6K signaling pathway as molecular signaling mechanism of plant growth promotion.

As previously discussed, it was established that the bacterial CDPs activate the auxin pathway in *A. thaliana*, however, the effects of CDPs on growth and development in this plant are different than those induced by auxinic compounds, opening the possibility that the activation of TOR signaling pathway in plants is also induced through alternative mechanisms. In our lab we are working on clarifying the CDPs action mechanism in plants, trying to find the molecular targets involved. As occurs in *Arabidopsis*, molecular docking studies could reveal some of the TOR pathway component involved in the CDPs interaction. In addition, with transcriptional studies we could establish whether the CDPs modify the expression of some plant TOR signaling pathway actors.

ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

Funding

This work was supported by the Coordinación de la Investigación Científica-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CIC-UMSNH) program 2016-17, and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)-México, grants number 222405 and number 256119. Iván Corona-Sánchez and Omar González-López were the recipients of CONACyT fellowships, numbers 584655 and 259020, respectively. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

Coordinación de la Investigación Científica-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (CIC-UMSNH) program 2016-17.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)-México: 222405 and 256119.
CONACyT fellowships: 584655 and 259020.

Competing Interests

Jesus Campos-Garcia is an Academic Editor for *PeerJ*.

Author Contributions

- Iván Corona-Sánchez performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.
- Cesar Arturo Peña-Urbe performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.
- Omar González-López performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.
- Javier Villegas conceived and designed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.
- Jesus Campos-Garcia conceived and designed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.
- Homero Reyes de la Cruz conceived and designed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, prepared figures and/or tables, approved the final draft.

Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

Raw figure data are available in the [Supplemental Files](#).

Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.7494#supplemental-information>.

REFERENCES

- Agredano-Moreno LT, Reyes de la Cruz H, Martínez-Castilla LP, Sánchez de Jiménez E. 2007. Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Molecular Biosystems* 3(11):794 DOI 10.1039/b705803a.
- Ahmed MA, Zarebanadkouki M, Kaestner A, Carminati A. 2016. Measurements of water uptake of maize roots: the key function of lateral roots. *Plant and Soil* 398(1-2):59-77 DOI 10.1007/s11104-015-2639-6.
- Ahn CS, Ahn H-K, Pai H-S. 2014. Overexpression of the PP2A regulatory subunit Tap46 leads to enhanced plant growth through stimulation of the TOR signalling pathway. *Journal of Experimental Botany* 66(3):827-840 DOI 10.1093/jxb/eru438.
- Bakshi A, Moin M, Madhav MS, Kirti PB. 2019. Target of rapamycin, a master regulator of multiple signalling pathways and a potential candidate gene for crop improvement. *Plant Biology* 21(2):190-205 DOI 10.1111/plb.12935.
- Belin P, Moutiez M, Lautru S, Seguin J, Pernodet J-L, Gondry M. 2012. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. *Natural Product Reports* 29(9):961 DOI 10.1039/c2np20010d.

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254 DOI 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Cronan JM, Davidson TR, Singleton FL, Colwell RR, Cardellina JH. 1998. Plant growth promoters isolated from a marine bacterium associated with *Palythoa* sp. *Natural Product Letters* 11(4):271-278 DOI 10.1080/10575639808044959.
- Degrassi G, Aguilar C, Bosco M, Zahariev S, Pongor S, Venturi V. 2002. Plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358 produces and secretes four cyclic dipeptides: cross-talk with quorum sensing bacterial sensors. *Current Microbiology* 45(4):250-254 DOI 10.1007/s00284-002-3704-y.
- Dobrenel T, Caldana C, Hanson J, Robaglia C, Vincentz M, Veit B, Meyer C. 2016a. TOR signaling and nutrient sensing. *Annual Review of Plant Biology* 67(1):261-285 DOI 10.1146/annurev-arplant-043014-114648.
- Dobrenel T, Mancera-Martínez E, Forzani C, Azzopardi M, Davanture M, Moreau M, Schepetilnikov M, Chicher J, Langella O, Zivy M, Robaglia C, Ryabova LA, Hanson J, Meyer C. 2016b. The arabidopsis TOR kinase specifically regulates the expression of nuclear genes coding for plastidic ribosomal proteins and the phosphorylation of the cytosolic ribosomal protein S6. *Frontiers in Plant Science* 7:1611 DOI 10.3389/fpls.2016.01611.
- Eng CP, Sehga SN, Vézina C. 1984. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *Journal of Antibiotics* 37(10):1231-1237 DOI 10.7164/antibiotics.37.1231.
- Fenton TR, Gout IT. 2011. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43(1):47-59 DOI 10.1016/j.biocel.2010.09.018.
- Gangloff Y-G, Mueller M, Dann SG, Svoboda P, Sticker M, Spetz J-F, Um SH, Brown EJ, Cereghini S, Thomas G, Kozma SC. 2004. Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Molecular and Cellular Biology* 24(21):9508-9516 DOI 10.1128/MCB.24.21.9508-9516.2004.
- García Flores C, Aguilar R, Reyes de la Cruz H, Albores M, Sánchez de Jiménez E. 2001. A maize insulin-like growth factor signals to a transduction pathway that regulates protein synthesis in maize. *Biochemical Journal* 358(1):95-100 DOI 10.1042/bj3580095.
- González O, Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Díaz-Pérez AL, 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 DOI 10.1007/s00248-016-0896-4.
- Grzesiak MT. 2009. Impact of soil compaction on root architecture, leaf water status, gas exchange and growth of maize and triticale seedlings. *Plant Root* 3:10-16 DOI 10.3117/plantroot3.10.
- Hernández-Padilla L, Vázquez-Rivera D, Sánchez-Briones LA, Díaz-Pérez AL, Moreno-Rodríguez J, Moreno-Eutimio MA, Meza-Carmen V, Reyes-de la Cruz H, Campos-García J. 2017. The antiproliferative effect of cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on HeLa cells involves inhibition of phosphorylation of Akt and S6k kinases. *Molecules* 22(6):1024 DOI 10.3390/molecules22061024.
- Ienaga K, Nakamura K, Kurohashi M, Nakanishi T, Ichii T. 1990. Hydroxyproline-containing diketopiperazines inducing drought resistance in rice. *Phytochemistry* 29(1):35-39 DOI 10.1016/0031-9422(90)89005-T.
- Jansen L, Roberts I, De Rycke R, Beekman T. 2012. Phloem-associated auxin response maxima determine radial positioning of lateral roots in maize. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367(1595):1525-1533 DOI 10.1098/rstb.2011.0239.

- Kamada Y, Fujioka Y, Suzuki NN, Inagaki F, Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN, Ohsumi Y. 2005. Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Molecular and Cellular Biology* 25(16):7239–7248 DOI 10.1128/MCB.25.16.7239-7248.2005.
- Kimura Y, Sawada A, Kuramata M, Kusano M, Fujioka S, Kawano T, Shimada A. 2005. Brevicompanine C, Cyclo-(d-Ile-l-Trp), and Cyclo-(d-Leu-l-Trp), plant growth regulators from *Penicillium brevicompactum*. *Journal of Natural Products* 68(2):237–239 DOI 10.1021/np040178p.
- Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. 2012. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochemical Journal* 441(1):1–21 DOI 10.1042/BJ20110892.
- Martel RR, Klicius J, Galet S. 1977. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 55(1):48–51 DOI 10.1139/y77-007.
- Martínez-de la Cruz E, García-Ramírez E, Vázquez-Ramos JM, Reyes de la Cruz H, López-Bucio J. 2015. Auxins differentially regulate root system architecture and cell cycle protein levels in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology* 176:147–156 DOI 10.1016/j.jplph.2014.11.012.
- Menand B, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C, Robaglia C. 2002. Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(9):6422–6427 DOI 10.1073/pnas.092141899.
- Meyuhas O. 2015. Ribosomal protein S6 phosphorylation. In: Jeon KW, ed. *International Review of Cell and Molecular Biology*. Cambridge: Academic Press, 41–73.
- Meyuhas O, Dreazen A. 2009. Chapter 3 ribosomal protein S6 kinase. In: Hershey JWB, ed. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Cambridge: Academic Press, 109–153.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473–497 DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Niles BJ, Powers T. 2014. TOR complex 2-Ypk1 signaling regulates actin polarization via reactive oxygen species. *Molecular Biology of the Cell* 25(24):3962–3972 DOI 10.1091/mbc.e14-06-1122.
- Ortiz-Castro R, Campos-García J, López-Bucio J. 2019. *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* influence *Arabidopsis* root system architecture through an auxin response mediated by bioactive cyclodipeptides. *Journal of Plant Growth Regulation* 72:2070 DOI 10.1007/s00344-019-09979-w.
- Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Río RE, 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 of the United States of America* 108(17):7253–7258 DOI 10.1073/pnas.1006740108.
- Park K, Park Y-S, Ahamed J, Dutta S, Ryu H, Lee S-H, Balaraju K, Manir M, Moon S-S. 2016. Elicitation of induced systemic resistance of chili pepper by iturin A analogs derived from *Bacillus vallismortis* EXTN-1. *Canadian Journal of Plant Science* 96(4):564–570 DOI 10.1139/cjps-2015-0199.
- Reyes de la Cruz H, Aguilar Rúl, Sánchez de Jiménez E. 2004. Functional characterization of a maize ribosomal S6 protein kinase (ZmS6K), a plant ortholog of metazoan p70 S6K. *Biochemistry* 43(2):533–539 DOI 10.1021/bi035222z.
- Rispol D, Eltschinger S, Stahl M, Vaga S, Bodenmiller B, Abraham Y, Filipuzzi I, Movva NR, Aebersold R, Helliwell SB, Loewith R. 2015. Target of rapamycin complex 2 regulates actin polarization and endocytosis via multiple pathways. *Journal of Biological Chemistry* 290(24):14963–14978 DOI 10.1074/jbc.M114.627794.

- Schepetilnikov M, Dimitrova M, Mancera-Martínez E, Geldreich A, Keller M, Ryabova LA. 2013. TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO Journal* 32(8):1087–1102 DOI 10.1038/emboj.2013.61.
- Schepetilnikov M, Ryabova LA. 2018. Recent discoveries on the role of TOR (target of rapamycin) signaling in translation in plants. *Plant Physiology* 176(2):1095–1105 DOI 10.1104/pp.17.01243.
- Taramino G, Sauer M, Stauffer JL Jr, Multani D, Niu X, Sakai H, Hochholdinger F. 2007. The maize (*Zea mays* L.) RTCS gene encodes a LOB domain protein that is a key regulator of embryonic seminal and post-embryonic shoot-borne root initiation. *Plant Journal* 50(4):649–659 DOI 10.1111/j.1365-3113X.2007.03075.x.
- Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *Journal of Antibiotics* 28(10):721–726 DOI 10.7164/antibiotics.28.721.
- Wulschleger S, Loewith R, Hall MN. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124(3):471–484 DOI 10.1016/j.cell.2006.01.016.
- Xiong F, Dong P, Liu M, Xie G, Wang K, Zhuo F, Feng L, Yang L, Li Z, Ren M. 2016. Tomato FK506 binding protein 12KD (FKBP12) mediates the interaction between rapamycin and target of rapamycin (TOR). *Frontiers in Plant Science* 7:1746 DOI 10.3389/fpls.2016.01746.
- Xiong Y, Sheen J. 2012. Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *Journal of Biological Chemistry* 287(4):2836–2842 DOI 10.1074/jbc.M111.300749.
- Zhu J, Mickelson SM, Kaepler SM, Lynch JP. 2006. Detection of quantitative trait loci for seminal root traits in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under differential phosphorus levels. *Theoretical and Applied Genetics* 113(1):1–10 DOI 10.1007/s00122-006-0260-z.



Non-ribosomal Peptide Synthases from *Pseudomonas aeruginosa* Play a Role in Cyclodipeptide Biosynthesis, Quorum-Sensing Regulation, and Root Development in a Plant Host

Omar González¹ · Randy Ortiz-Castro^{2,3} · César Díaz-Pérez⁴ · Alma L. Díaz-Pérez¹ · Viridiana Magaña-Dueñas² · José López-Bucio² · Jesús Campos-García¹

Received: 3 September 2016 / Accepted: 6 November 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Diverse molecules mediate cross-kingdom communication between bacteria and their eukaryotic partners and determine pathogenic or symbiotic relationships. *N*-acyl-L-homoserine lactone-dependent quorum-sensing signaling represses the biosynthesis of bacterial cyclodipeptides (CDPs) that act as auxin signal mimics in the host plant *Arabidopsis thaliana*. In this work, we performed bioinformatics, biochemical, and plant growth analyses to identify non-ribosomal peptide synthase (NRPS) proteins of *Pseudomonas aeruginosa*, which are involved in CDP synthesis. A reverse genetics strategy allowed the identification of the genes encoding putative multi-modular-NRPS (MM-NRPS). Mutations in these genes affected the synthesis of the CDPs cyclo(L-Pro-L-Val), cyclo(L-Pro-L-Leu), and cyclo(L-Pro-L-Tyr), while showing wild-type-like levels of virulence factors, such as violacein, elastase, and pyocyanin. When analyzing the bioactivity of purified, naturally produced CDPs, it

was found that cyclo(L-Pro-L-Tyr) and cyclo(L-Pro-L-Val) were capable of antagonizing quorum-sensing-LasR (QS-LasR)-dependent signaling in a contrasting manner in the cell-free supernatants of the selected NRPS mutants, which showed QS induction. Using a bacteria-plant interaction system, we further show that the *pxdJ*, *ambB*, and *pchE* *P. aeruginosa* mutants failed to repress primary root growth, but improved root branching in *A. thaliana* seedlings. These results indicated that the CDP production in *P. aeruginosa* depended on the functional MM-NRPS, which influences quorum-sensing of bacteria and plays a role in root architecture remodeling.

Keywords *Pseudomonas aeruginosa* · Cyclodipeptides · Non-ribosomal peptide synthases · Quorum-sensing · Plant-growth promotion · Siderophores

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00248-016-0896-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jesús Campos-García
jcgarcia@umich.mx

¹ Laboratorio de Biotecnología Microbiana, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. B-3, Ciudad Universitaria, 58030 Morelia, Michoacán, México

² Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal, Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edif. A1', Ciudad Universitaria, 58030, Morelia, Michoacán, México

³ Instituto de Ecología A.C., Xalapa, Ver., México

⁴ Depto. Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Universidad de Guanajuato, Salvatierra, Gto., México

Introduction

Bacteria establish pathogenic or symbiotic relationships with their eukaryotic hosts. *Pseudomonas aeruginosa*, a well-known human and plant pathogen, proliferates in the rhizosphere, a narrow zone of soil influenced by root exudates. The mechanisms occurring in *P. aeruginosa* to overcome host defenses include the production of toxins, adhesins, pyocyanin, and other virulence factors; however, there is very little knowledge about the mechanisms by which *P. aeruginosa* modulates plant growth and development [1, 2].

P. aeruginosa performs cell-to-cell communication via a regulatory mechanism known as quorum-sensing (QS), which regulates gene expression in response to fluctuations in the bacterial density and coordinates many physiological processes, such as production of virulence factors, resistance to oxidative stress, antibiotic resistance, motility, and biofilm formation [3–5]. The *las* and *rhl* QS systems are dependent on *N*-(3-

oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) and *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL), respectively. These compounds are synthesized by the acyl-L-homoserine lactone (AHL) synthases, encoded by the *lasI* and *rhlI* genes [4, 6, 7]. A third QS system involves the 2-heptyl-3-hydroxy-4-(1*H*)-quinolone (PQS) and 2-heptyl-4-hydroxyquinolone (HHQ), encoded by the *pqs* gene cluster [4, 8]. These systems further link signal transduction to transcription factors of the LysR-type, namely LasR, RhlR, and PqsR, which specifically respond to the cognate signal molecules and activate hundreds of genes [4]. Signaling hierarchy, upstream of the *pqs* and *rhl* systems, is further defined by the signaling molecule, 2-(2-hydroxyphenyl)-thiazole-4-carbaldehyde (IQS, also called as aeruginaldehyde), which is synthesized by the *ambBCDE* gene cluster and plays an important role in pathogenesis via the production of pyochelin siderophores [4, 5, 9]. The *ambBCDE* cluster encodes enzymes for L-2-amino-4-methoxy-*trans*-3-butenoic acid (AMB) biosynthesis, which occurs via a non-ribosomal peptide synthase (NRPS) pathway and shows toxic effects to prokaryotes and eukaryotes [10].

A vast number of natural, organic molecules modulate QS and cross-kingdom interactions in evolutionary distant organisms, especially the cyclodipeptides (CDPs) and 2,5-diketopiperazines. CDPs are cyclized molecules comprising two amino acids linked by peptide bonds; they are produced by a wide range of organisms, from bacteria to fungi and animals [11]. CDPs belong to the non-ribosomal peptides that are synthesized by either NRPS, which use free amino acids, or CDP synthases, which utilize amino-acylated transfer RNAs (aa-tRNAs) as substrates [12]. NRPS synthesize peptides independently of the mRNA ribosomal machinery via their multi-modular structure, which is characterized mainly by three core domains: an adenylation domain (A), responsible for the selection, activation, and transfer of the amino acid; a thiolation domain (T) that binds the amino acid covalently to the thiol of the 4'-phosphopantetheine prosthetic group (also called as PCP domain), and transports it to the condensation domain (C), for peptide bond formation from the C to N direction between the upstream and downstream aminoacyl thioesters. Release of the former peptide from the NRPS is often accompanied by the cyclization through the activity of the thioesterase (TE) domain, and subsequent modifications, such as reduction, methylation, or epimerization, may occur in the CDP molecule during the peptide synthesis [13, 14].

Recent data points to CDPs as a novel group of biomolecules influencing QS signaling. The CDPs: cyclo(D-Ala-L-Val) and cyclo(L-Pro-L-Tyr), inhibit the activity of regulatory LuxR-type proteins that are involved in AHL-dependent QS regulation [15, 16]. In addition, the *lasI*-dependent QS system represses the CDP biosynthesis, and this is a determinant factor in the underlying interaction with *Arabidopsis thaliana* plants, since cyclo(L-Pro-L-Tyr), cyclo(L-Pro-L-Val), and cyclo(L-Pro-L-Phe) appear to mimic the biological role of auxin, a natural phytohormone [17].

In this report, we employed bioinformatics and functional approaches to identify probable NRPS from *P. aeruginosa* PAO1 wild-type (WT) strain and studied the role of CDPs in bacterial physiology and interaction with plants. Selected mutants defective in putative MM-NRPS had altered CDP production, which however, did not affect their virulence, but interfered with the QS systems in high concentrations, possibly interacting with the binding site of the cognate AHL to its receptor. By using the dual *P. aeruginosa*-*A. thaliana* co-cultivation systems, we demonstrated that the capacity of the selected WT and NRPS mutants to repress root growth and promote root branching is tightly related to AHL-dependent QS status and is modified by CDPs levels in vivo.

Materials and Methods

Bacterial Strains, Plasmids, and Culture Conditions

Mutant bacterial strains were derived from the *P. aeruginosa* PAO1 WT strain (Table 1). The transposon insertion site in most mutants is located within the open reading frame [19]. The strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth or M9 minimal medium (MM-9) with 0.2% (*w/v*) glucose at 30 °C, with shaking. Solidified media were prepared by adding 1.5% (*w/v*) agar. Antibiotic concentrations used for *P. aeruginosa* selection were 200 µg/mL streptomycin and 60 µg/mL tetracycline, and for *Escherichia coli* JM109 (pSB1075) was 100 µg/mL ampicillin.

Solvent Extraction and Chemical Characterization of Cyclodipeptides

Approximately, 2.5×10^8 CFUs of *P. aeruginosa* WT and mutant strains were inoculated in 100 mL of MM-9 and incubated in a growth cabinet for 24 h at 30 °C. Cell-free supernatants were extracted by centrifugation at $10,000 \times g$ at 20–25 °C for 10 min. The CDPs from these cultures were extracted and purified as previously described [17]. The resulting supernatant was extracted twice with two volumes of ethyl acetate supplied with acetic acid (0.1 mL/L). The extracts were evaporated to dryness using a rotavapor at 60 °C under vacuum. The residue was dissolved in methanol/acetonitrile (1:1), concentrated and dissolved to 1 mL of in high performance liquid chromatography (HPLC)-grade acetonitrile. HPLC was done by using a Photo Diode Array detector and a Sephasil-Peptide C18, 12 µ 4.6 mm × 250 mm (Amersham) reverse-phase HPLC column for the sample analysis. Fractions were eluted with water/acetonitrile, starting with an equilibration solvent mix of 0:100; followed by a linear gradient of 60:40, with a flow of 1 mL/min for 15 min; finally, following with a return to 0:100 solvent mix for 3 min and an equilibrium phase for 2 min. The deionized water and HPLC-grade acetonitrile were

Table 1 Bacterial strains and mutants used in this work

Strain	Characteristic	Reference
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Laboratory standard strain of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	[18]
JM2	<i>P. aeruginosa</i> PAO1, $\Delta lasI$, $\Delta rhlI$ double mutant; Tc ^r	[18]
PAO1:: <i>lasI</i>	<i>P. aeruginosa</i> PAO1, $\Delta lasI$, mutant; Tc ^r	[18]
PA2402 (ID 468)	PAO1 transposon IS <i>lacZ</i> hah mutant in the ORF PA2402, ($\Delta pvdI$)	[19]
PA2424 (ID 778)	PAO1 transposon IS <i>lacZ</i> hah mutant in the ORF PA2424, ($\Delta pvdL$)	[19]
PA2400 (ID 3265)	PAO1 transposon IS <i>lacZ</i> hah mutant in the ORF PA2400, ($\Delta pvdJ$)	[19]
PA2302 (ID 4216)	PAO1 transposon IS <i>lacZ</i> hah mutant in the ORF PA2302, ($\Delta ambE$)	[19]
PA2305 (ID 8984)	PAO1 transposon IS <i>lacZ</i> hah mutant in the ORF PA2305, ($\Delta ambB$)	[19]
PA4078 (ID 21095)	PAO1 transposon IS <i>lacZ</i> hah mutant in the ORF PA4078	[19]
PA4225 (ID 41376)	PAO1 transposon IS <i>lacZ</i> hah mutant in the ORF PA4225, ($\Delta pchF$)	[19]
PA3327 (ID 45465)	PAO1 transposon IS <i>lacZ</i> hah mutant in the ORF PA3327	[19]
PA4226 (ID 49903)	PAO1 transposon IS <i>lacZ</i> hah mutant in the ORF PA4226, ($\Delta pchE$)	[19]
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 31532	Laboratory standard strain of <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 31532	[20]
<i>C. violaceum</i> CV026	<i>C. violaceum</i> mini-Tn5 mutant of ATCC 31532 strain	[20]

filtrated and degasified. The extracts were analyzed for CDPs identification by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) as previously described [17]. CDP quantitation was assessed by measuring the area units showed in chromatograms, obtained from the HPLC analysis. For purification of CDPs, 1 mL of ethyl acetate extract was applied to the HPLC system using a C₁₈ semi-preparative column (Econosil C₁₈ 10 U 250 mm × 22 mm; Alltech). HPLC fractions were eluted in water/acetonitrile, starting with a calibration system of 0:100, followed by a linear gradient of 60:40, with a flow of 5 mL/min for 40 min; a linear gradient of 90:10, with a flow 5 mL/min for 10 min; a linear gradient of 0:100 with a flow 5 mL/min and ending with a calibration for 15 min with a flow 5 mL/min. The deionized water and HPLC-grade acetonitrile were filtrated and degasified. The fractions were collected and concentrated by lyophilization. The purified fractions were subsequently analyzed by HPLC and GC-MS.

Induction of Violacein by *P. aeruginosa* Strains in the Biosensor Strain *Chromobacterium violaceum* CV026

Fifty microliters of an overnight culture of *C. violaceum* CV026 was plated over the surface of agar dishes supplied with LB medium. Then, 5 μ L LB liquid cultures of the *P. aeruginosa* strains was placed over the surface of the plates and incubated at 37 °C to monitor the violacein synthesis by measuring the purple pigmentation halos [20].

Determination of Pyocyanin and Elastase in Cultures of the *P. aeruginosa* Strains

Pyocyanin was extracted from the supernatant fraction of *P. aeruginosa* cultures grown in LB medium at 37 °C for 48 h. The supernatant (1 mL) was mixed with 1 mL of chloroform and the organic fraction was collected, and mixed with 1 mL 0.2 N HCl. The organic fraction was separated and the absorbance was measured at 520 nm for pyocyanin determination [21]. Elastase was measured in culture supernatants from *P. aeruginosa* strains using the Elastin Congo Red assay (ECR) [22]. Briefly, strains were grown overnight in 1 mL of LB medium and the culture was harvested by centrifugation at 7000 rpm for 10 min. Supernatant (250 μ L) was added with 10 mg of ECR, dissolved in 0.1 M Tris-HCl and 1 mM CaCl₂, pH 7, and incubated for 16 h at 37 °C with shaking. The remaining ECR was eliminated by centrifugation at 10,000 ×g for 5 min, and the absorbance of the supernatant was measured at 495 nm in a spectrophotometer.

Quorum-Sensing Assays

The QS AHL-dependent assay was performed using the *E. coli* JM109 reporter strain transformed in the pSB1075 plasmid, which contains the transcriptional fusion *placRlasI**RhlI*:*luxCDABE*, and produces luminescence in response to 3-oxo-C12-HSL [23]. *E. coli* JM109 (pSB1075) was grown overnight in LB liquid medium at 37 °C with shaking. Then the culture was diluted with fresh LB medium to obtain an

optical density (OD) of 0.1 at 600 nm (OD₆₀₀) and 200 µL was distributed in each well of a 96-well culture plate. Two or 10 nM of the solvent or 3-oxo-C12-HSL (Sigma-Aldrich) was added to the bacterial growth media and incubated for 2 h. Subsequently, different concentrations of CDP mix, purification fractions, or 50 µL of *P. aeruginosa* culture supernatants were added, followed by incubation at 37 °C, with slight shaking. Both the OD₆₀₀ and luminescence were determined by using a ChemIDoc MP imaging system (BioRad).

Plant Material, Growth Conditions, and Bacterial Co-cultivation Assays

A. thaliana (Col-0) seeds were surface sterilized with 95% (v/v) ethanol for 5 min, and 20% (v/v) bleach for 7 min. After five

washes with sterile distilled water, seeds were placed to germinate and grow on the surface of agar plates containing 0.2× Murashige and Skoog medium (Murashige & Skoog basal salts mixture, Sigma). The suggested formulation is 4.3 g/L of salts for preparing 1× concentration of medium [17]; we used 0.9 g/L of salts, which we referred to as MS 0.2×. This medium lacked amino acids and vitamins. We used Phytagar (Micropropagation grade; Phytotechnology) to solidify the media and prepare the plates. The plates containing the seeds were placed in a plant growth chamber with a photoperiod of 16 h light (100 µmol/m²s), 8 h darkness, and 80% humidity at a temperature of 22 °C.

Bacterial densities of 2.5 × 10⁸ CFU were inoculated by streaking on the agar plates containing 0.2× MS medium. Six-day-old germinated *Arabidopsis* seedlings (eight

Table 2 Data obtained of the protein sequence alignment of AusA from *S. aureus* with *P. aeruginosa* PAO1 genome

ORF	Product name	% identity	E-value	Query cover %	Domains	# modules	# of AA
AusA	Aureusimine synthetase [<i>Staphylococcus aureus</i>]	—	—	—	C-Aa-T-C-X-Aa-T-R	(2)	(2397)
LgtA	Gramicidin synthetase [<i>Brevibacillus brevis</i>]	34	0	80	FT-Aa-T-C-Aa-T-C	(2)	(2275)
PA2402*	Pyoverdine synthetase J, PvdJ	36	0	94	C-X-Aa-T-C-C-Aa-T-C-X-Aa-T-C-C-Aa-T	(4)	(5149)
PA2424*	Pyoverdine synthetase L, PvdL	35	0	91	A-T-C-X-Aa-T-C-X-Aa-T-C-C-Aa-T	(4)	(4342)
PA2399*	Pyoverdine synthetase D, PvdD	35	0	91	C-X-Aa-T-C-X-Aa-T-TE	(2)	(2448)
PA2400*	Pyoverdine synthetase J, PvdJ	34	0	89	C-X-Aa-T-C-X-Aa-T	(2)	(2157)
PA3327*	Probable non-ribosomal peptide synthetase	31	0	83	C-Aa-T-C-A-T-TE	(2)	(2352)
PA2305*	Nonribosomal peptide synthetase, AmbB	30	6e-107	77	Aa-T-C	(1)	(1249)
PA4078*	Probable nonribosomal peptide synthetase	32	2e-80	51	Aa-T-R	(1)	(991)
PA4225*	Pyochelin synthetase, PchF	26	2e-66	65	C-NRS-A-MT-T-TE	(1)	(1809)
PA4226*	Dihydroaeruginosic acid synthetase, PchE	26	5e-63	62	F-C-NRS-A-T	(1)	(1438)
PA2302*	Nonribosomal peptide synthetase, AmbE	24	4e-52	84	A-MT-T-C-T-TE	(1)	(2124)
PA1221	Hypothetical protein	28	6e-51	49	Aa-T	(inc)	(618)
PA4733	Acetyl-coenzyme A synthetase, AcsB	24	2e-28	41	NRS-Aa	(inc)	(645)
PA0887	Acetyl-coenzyme A synthetase, AcsA	24	8e-28	21	NRS-Aa	(inc)	(651)
PA2557	Probable AMP-binding enzyme	26	1e-28	29	Aa	(inc)	(564)
PA3300	Long-chain-fatty-acid—CoA ligase, FadD2	24	8e-28	21	Aa	(inc)	(562)
PA3299	Long-chain-fatty-acid—CoA ligase, FadD1	24	3e-26	21	Aa	(inc)	(562)
PA4228	Pyochelin biosynthesis protein, PchD	26	3e-11	38	Aa	(inc)	(547)
PA4198	Probable AMP-binding enzyme	24	7e-11	37	Aa	(inc)	(540)
PA3860	Probable AMP-binding enzyme	24	5e-10	37	Aa	(inc)	(632)
PA3924	Probable medium-chain acyl-CoA ligase	22	2e-09	35	Aa	(inc)	(560)
PA3568	Probable acetyl-coA synthetase	21	3e-07	32	T-Aa	(inc)	(628)
PA2555	Probable AMP-binding enzyme	24	9e-06	25	Aa	(inc)	(555)

A the adenylation domain of nonribosomal peptide synthetases (NRPS), a additional domain found in the C terminal of the adenylation domain (A), C condensation domain, T thiolation domain, X, HxxPF-repeated domain of NRPS, FT, formyl-transferase domain, R NAD(P)-binding motifs, MT methyl-transferase domain, TE esterases and lipases domain, NRS adenylation domain of NRPS, inc incomplete core of multidomains described in putative NRPS (A-T-C), # of AA number of amino acids contained in the protein

seedlings per plate) were grown to one side of the plate, opposite to the inoculation site. Inoculation was performed at a 5-cm distance from the root tip. The seedlings were grown for a further 8-day period by placing the plates in the growth chamber in a completely randomized design. In another set of experiment, 6-day-old *Arabidopsis* seedlings were transferred to plates with a bacterial streak, placing the roots in direct contact with bacterial colonies. All experiments were replicated at least three times.

Analysis of Growth and Statistical Analysis

Growth of primary roots was measured using a ruler. Lateral root (LR) number and lateral root density (LRD) was determined by counting the number of lateral roots present in the primary root from the tip to the root/stem transition. Lateral root density was determined by dividing the lateral root number by the primary root length and expressed as LRD/centimeter. For all experiments, the overall data were statistically analyzed by using the Graph Pad program; one-way analysis of variance (ANOVA) analyses with a Bonferroni or Tukey's post-hoc test were performed for testing differences in growth and root developmental parameters.

Bioinformatics Procedures

To identify putative NRPSs in the *P. aeruginosa* PAO1 genome, a blastp algorithm (BLOSUM62) of the NCBI home page (www.ncbi.org) was applied in the protein alignment using the dimodular amino acid sequence as targets, the AusA NRPS from *Staphylococcus aureus* [24], and the LgrA NRPS from *Brevibacillus brevis* NBRC 100599 [14]. Additionally, the putative NRPSs with the major identity percent (30–36%) were used to re-run the blastp analysis over the PAO1 genome. The resulting putative NRPSs were further analyzed to identify functional domains in the amino acid sequences using the PHMMER software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/hammer/search/phmmer>).

For docking analysis, AutoDock 4.2.6 software for rigid and flexible molecular docking calculations was used [25]. The LasR transcriptional regulator was obtained from *P. aeruginosa* PAO1 crystallized structure (PDB ID: 3IX3) with its 3-oxo-C12-HL ligand (PDB ID: OHN). CDP molecules used as co-ligands were cyclo(L-Pro-L-Tyr), cyclo(L-Pro-L-Val), and cyclo(L-Pro-L-Phe), whose modeling was carried out with VI EWDD molecular editor (Rome Center for Molecular Design, Lab). The LasR docking site was determined from the LasR crystallized structure with OHN ligand; a grid box was set to cover the docking site. One hundred docking runs were performed, using the Lamarckian genetic algorithm in AutoDock 4.2.6. A file comprising all possible conformers was analyzed by AutoDock Tools [25]. The surface potential was calculated using the PDB2PQR server

(http://nber-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/) [26]. Figures were generated by using the PyMOL Molecular Graphics System v1.2r1 (Schrödinger, LLC). The CDPs docked-conformers were tested according to the following: (i) CDPs conformers with similar orientation to 3-oxo-C12-HSL in the LasR model; (ii) CDPs orientation overlapping with the 3-oxo-C12-HSL binding site in LasR; and (iii) CDPs conformers with the minimum binding-energy to LasR.

Results

Screening of Putative NRPS in the *P. aeruginosa* PAO1 Genome

To identify putative NRPS in the *P. aeruginosa* PAO1 genome, an amino acid sequence alignment was done using the blastp algorithm by comparing with the amino acid sequence targets, the AusA from *S. aureus* [24] and the LgrA

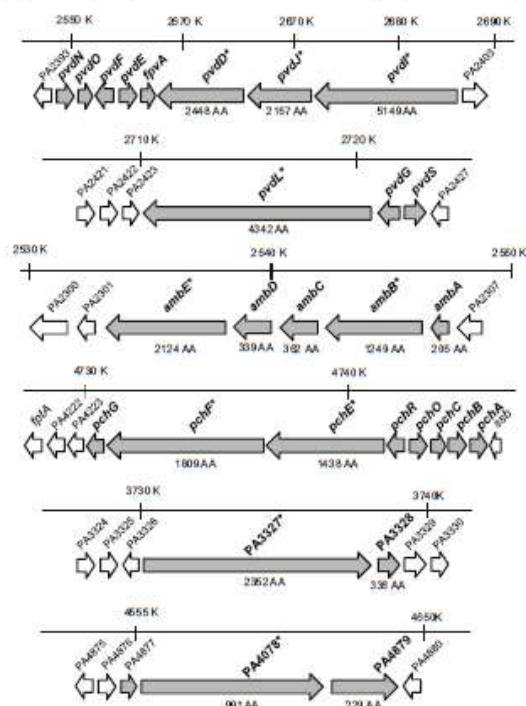


Fig. 1 Comparison of the putative locus of the *P. aeruginosa* PAO1 genome involved in NRPS synthesis. The numbers and orientation of ORFs are corresponding to the *P. aeruginosa* PAO1 genome (<http://www.pseudomonas.com>). The genomic region is indicated with numbers above each gene cluster; length of genes based on the number of amino acids is indicated with a number below the arrows. Dark arrows denote the genes corresponding to each cluster. Sizes of genes on ORFs are not at the same scales. Asterisks denote mutagenized genes

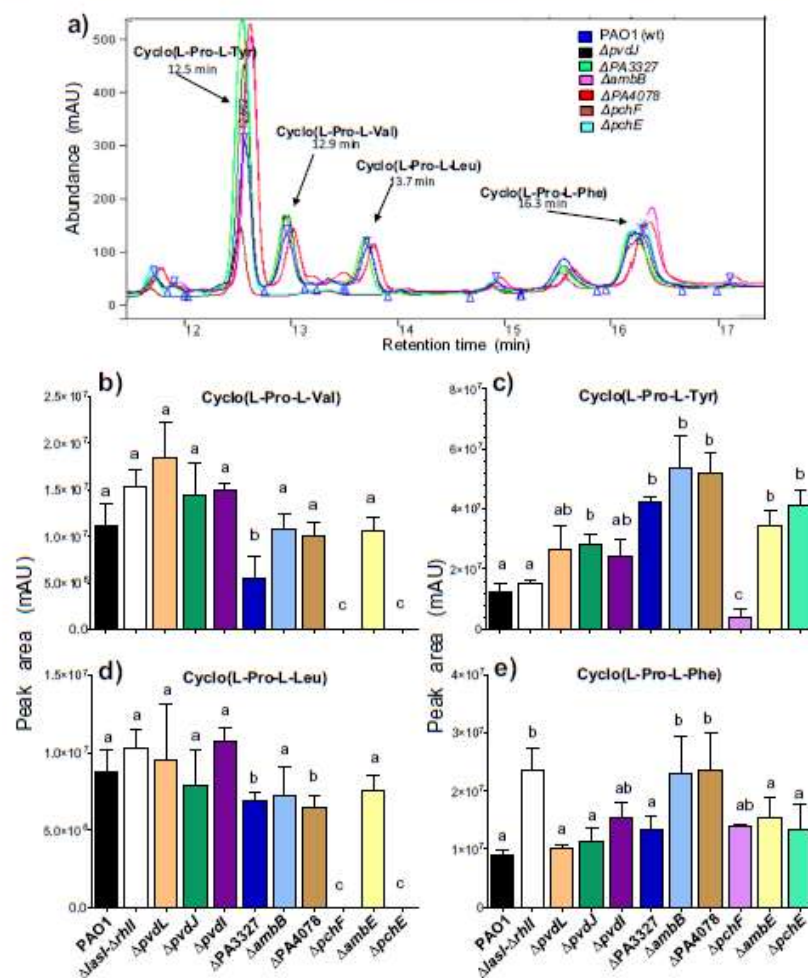
from *B. brevis* NBRC 100599 [14]. The alignment results revealed the adenylation domain (A) in around 55 putative NRPS homologues. Comparison of the amino acid sequences with major identity percent by a blastp analysis over the PAO1 genome identified 22 proteins (Table 2) and their functional domains A, T, C using the PHMMER software. This criterion led us to select 10 amino acid sequences as potential NRPS candidates (Table 2).

The target protein, AusA from *S. aureus*, possessed a duplicated A, T, C domain, following the pattern C-Aa-T-C-X-Aa-T-R. A similar structure was observed in the bimodular LgrA amino acid sequence from *B. brevis*, FT-Aa-T-C-Aa-T-C (Table 2, Fig. S1, Supplementary material). More detailed analyses yielded three domains, which have not been well described in the AusA protein sequence: the adenylation C-terminal domain (a), which is always

located in the C-terminal of the A domain; the HxxPF domain (X), which is found in NRPS and the reduction domain (R).

We observed that some of the putative NRPS proteins were integral to metabolic pathways that have been already described (Table 2). In the first group, the proteins PvdD (PA2399), PvdJ (PA2400-PA2401), PvdI (PA2402), and PvdL (PA2424) were involved in the synthesis of pyoverdine, and the corresponding genes were located on two different, but adjacent gene clusters of the *P. aeruginosa* PAO1 chromosome (Fig. 1). Another group of NRPS catalyzes the synthesis of pyochelin, PchF (PA4225) and PchE (PA4226). A third group includes AmbB (PA2305) and AmbE (PA2302) proteins, associated with IQS biosynthesis, with their genes belonging into the *ambABCDE* cluster. Finally, two hypothetical proteins with unknown functions were cataloged, i.e., PA3327

Fig. 2 Quantification of cyclodipeptides produced in the cultures of *P. aeruginosa* PAO1 mutants. **a** Representative HPLC chromatograms of culture supernatants of *P. aeruginosa*. Peaks with retention times corresponding to cyclo(L-Pro-L-Tyr), cyclo(L-Pro-L-Val), cyclo(L-Pro-L-Leu), and cyclo(L-Pro-L-Phe) are indicated. **b–e** Relative abundance of CDPs in ethyl-acetate extracts obtained from cultures of *Pseudomonas* strains, and analyzed by HPLC using a diode array detector selecting UV at 260 nm, and confirmation of their structures by GC-MS. Data represent the mean relative abundance (mAU). Bars represent the mean value \pm standard error (SE) of three independent experiments. One-way ANOVA analysis was carried out, with Tukey's post-hoc test; $n = 6$. Values for SE ($P < 0.05$) are shown in lowercase letters



and PA4078 ORFs with 2352 amino acids (showing two multi-modules) and 991 amino acids (with one multi-module), respectively (Table 2, Fig. 1). Interestingly, the PvdI and PvdL sequences consist of around 5000 amino acids (showing four multi-modules each); the PvdD, PvdJ, and PA3327 with around 2000 amino acids (with two multi-modules each); and the shorter proteins AmbE, AmbB, PchF, PchE, and PA4078 with around 1000 amino acids (showing only one multi-module) (Table 2). Another screening explored the existence of CDP synthases, aa-tRNAs-dependent enzymes, which are smaller compared with the multi-modular NRPS. Using the AlbC from *Streptomyces noursei* [27, 28], and NozA and NcdA sequences from the actinomycete *Nocardioopsis* sp. CMB-M0232 [29], possible homologue proteins to CDPS dependent on aa-tRNAs were identified, but these showed low identity scores and lacked critical domains (Table S1, Supplementary material), suggesting that PAO1 genome lacked aminoacyl-tRNA-dependent cyclodipeptide synthases. The above data allowed us to select members of the MM-NRPS synthases group to perform a reverse genetics study in order to identify *P. aeruginosa* enzymes possibly involved in CDP synthesis.

Production of Cyclodipeptides in *P. aeruginosa* NRPS-Related Mutants

To assess the possible function of NRPS candidate proteins, the WT PAO1, PvdL, PvdJ, PvdI, AmbB, AmbE, PchE, PchF, PA3327, and PA4078 *P. aeruginosa* mutants were grown in MM-9 and CDP content in the corresponding culture supernatants was determined by HPLC. Compound peaks of HPLC chromatograms corresponding to CDPs in the PAO1 culture were identified as follows: cyclo(L-Pro-L-Tyr) with retention time RT = 12.5 min, cyclo(L-Pro-L-Val) with RT = 12.9 min, cyclo(L-Pro-L-Leu) with RT = 13.7 min, and cyclo(L-Pro-L-Phe) with RT = 16.3 min (Fig. 2a; Fig. S2, Supplementary material).

Quantification of the relative area of the peaks showed that the cyclo(L-Pro-L-Val) and the cyclo(L-Pro-L-Leu) slightly increased in concentration in the *pvd* mutants with respect to the PAO1 strain, whereas the concentration of these CDPs diminished significantly in the PA3327 ORF mutant and were undetected in the $\Delta pchE$ and $\Delta pchF$ mutants (Fig. 2b, d). Interestingly, the cyclo(L-Pro-L-Tyr) increased significantly in the $\Delta pvdI$, $\Delta PA3327$, $\Delta ambB$, $\Delta ambE$, $\Delta PA4078$, and $\Delta pchE$ mutants, but diminished in the $\Delta pchF$ mutant (Fig. 2c). With respect to the cyclo(L-Pro-L-Phe), it was increased significantly in the $\Delta ambB$ and $\Delta PA4078$ mutants in similar levels as that of the *lasI-rhlI* double mutant. These findings indicated that the mutations in the putative NRPS identified directly or indirectly modified the synthesis of CDPs in the *P. aeruginosa* PAO1 strain.

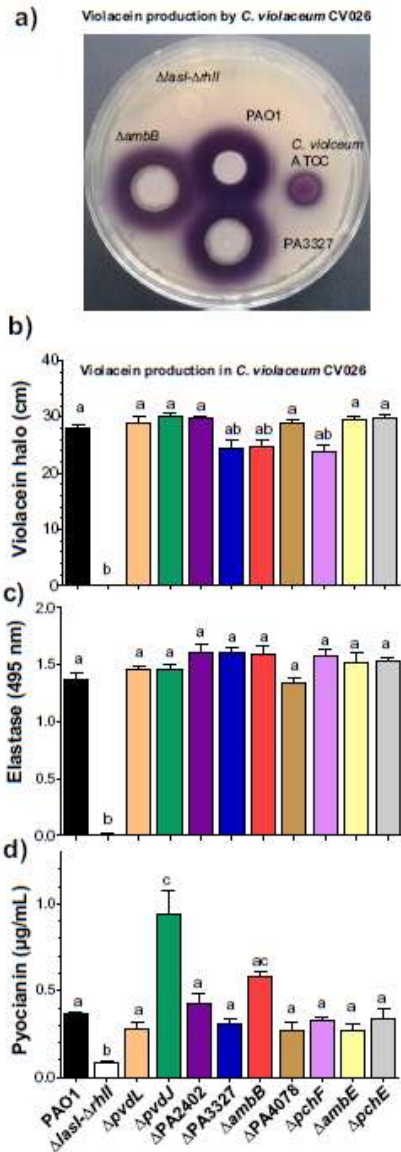


Fig. 3 Determination of virulence factors in the cultures of putative NRPS *P. aeruginosa* PAO1 mutants. **a, b** Determination of violacein halo in *C. violaceum* CV026 plates co-inoculated with *P. aeruginosa* mutants. **c, d** Determination of elastase and pyocyanin in the culture supernatants of *P. aeruginosa* WT and mutants as described in "Materials and Methods." Bars represent the mean \pm SE of three independent experiments. One-way ANOVA analysis was carried out, with Tukey's post-hoc test; $n = 3$. Values for SE ($P < 0.05$) are shown in lowercase letters

Effect of the Mutation in the Putative NRPS on QS Signaling of *P. aeruginosa*

Recent data indicates that the CDPs from natural origin or with synthetic modifications may function as agonists or antagonists of QS regulation in bacteria [15]. Thus, we determined the effect of the mutation in the putative NRPS on the QS-dependent bacterial responses mediated by the *las* and *pqs* systems using a biosensor, *C. violaceum* CV026 strain [20]. When compared to the WT *P. aeruginosa* PAO1, the QS *lasI-rhlI* double mutant, which is unable to produce AHLs, could not induce violacein production (Fig. 3a, b). In contrast, all the tested NRPS mutants showed an induction of violacein similar

to the WT PAO1 strain in *C. violaceum* CV026 (Fig. 3b). As expected, the levels of the virulence factors elastase and pyocyanin decreased in the *lasI-rhlI* double mutant, but not in most NRPS mutants, whose levels remained similar to that of the *P. aeruginosa* WT strain (Fig. 3c). Interestingly, pyocyanin production was increased in the $\Delta pvdJ$ mutant (Fig. 3d).

To assess the effect of the differential content and type of CDPs in the NRPS-PAO1 mutants on QS signaling, experiments were performed using a transcriptional fusion *plasR::luxCDABE* into *E. coli* JM109 (pSB1075) as a biosensor strain [15, 23]. The solvent-extract from *P. aeruginosa* PAO1 clearly induced the biosensor, and the bacteria emitted light. In contrast, the extracts from the *lasI* and *lasI/rhlI*

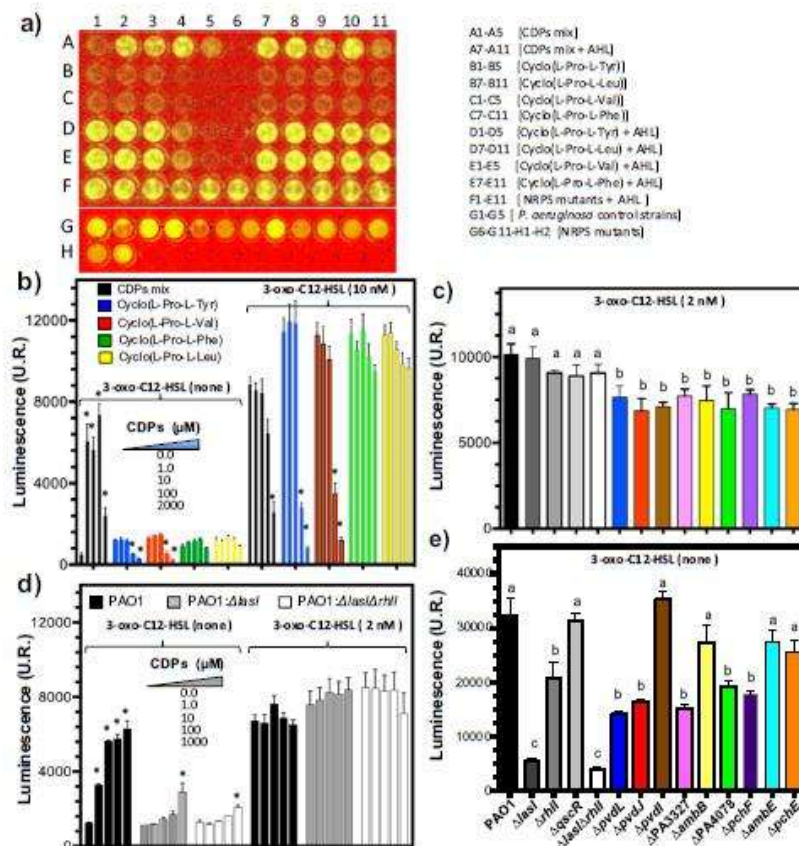


Fig. 4 Induction of the biosensor LasR-dependent by bioluminescence generation. The assay was performed using the *E. coli* JM109 reporter strain, transformed in the pSB1075 plasmid, which produces luminescence in response to 3-oxo-C12-HSL [23]. **a** Representative image of bioluminescence of *E. coli* JM109 (pSB1075) cultures in a 96-well culture plate after treatment. **b** Effect of the *P. aeruginosa* PAO1 CDPs and purified CDPs in the presence or absence of 3-oxo-C12-HSL inducer. **c** Effect of the solvent-extracts of the *P. aeruginosa* strains: PAO1 WT, PAO1:Δ*lasI* mutant and PAO1:Δ*lasI/rhlI* mutant,

in the presence and absence of 3-oxo-C12-HSL. **d, e** Effect of the culture supernatants of *P. aeruginosa* mutants grown for 48 h in LB broth in the presence or absence of 3-oxo-C12-HSL, respectively. Bars represent the mean ± SE of three independent experiments. One-way ANOVA analysis was carried out, with Bonferroni post-hoc test; $n=3$. Values for SE ($P<0.05$) with respect to control are shown with asterisks. Tukey's post-hoc test; $n=3$. Values for SE ($P<0.05$) are shown in lowercase letters

mutants failed to induce luminescence (Fig. 4a–c). The PAO1 CDPs mix at concentrations in the range of 2–100 μ M also induced light production in similar levels as that of the 3-oxo-C12-HSL (Fig. 4b). Greater concentrations of purified cyclo(L-Pro-L-Tyr) and cyclo(L-Pro-L-Val) antagonized the 3-oxo-C12-HSL induction of the QS-HSL-dependent biosensor, while cyclo(L-Pro-L-Leu) and cyclo(L-Pro-L-Phe) did not antagonize (Fig. 4a, b). These purified fractions were further tested as inducers of the *lux*-transcriptional fusion domain in a medium lacking 3-oxo-C12-HSL, which caused a slight induction of the biosensor, but consistently the cyclo(L-Pro-L-Tyr) and cyclo(L-Pro-L-Val) showed an antagonist effect on the biosensor strain at concentrations greater than 100 μ M (Fig. 4a, b).

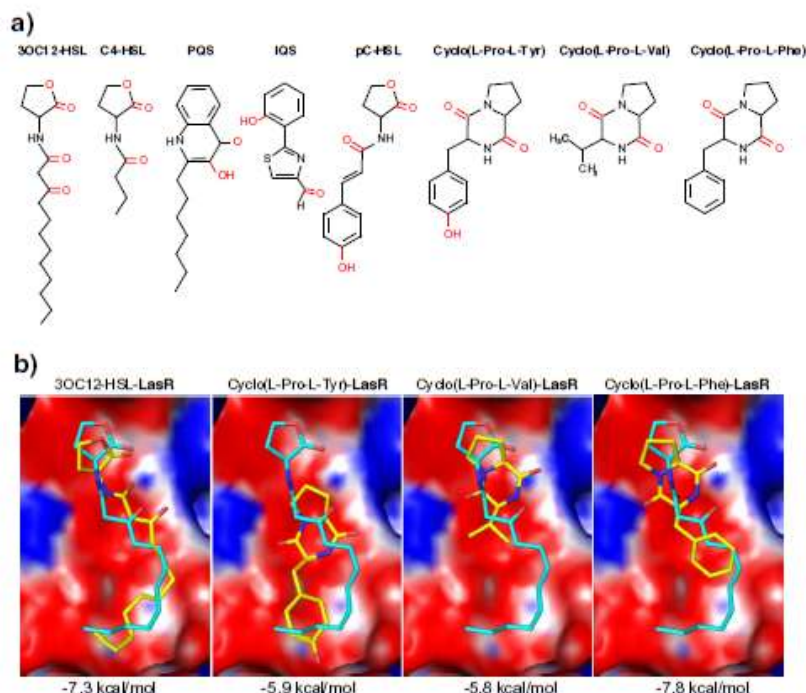
On the other hand, the cell-free supernatants of the putative NRPS mutants grown on LB medium showed a slight, but significant decrease of luminescence in the presence of its inducer 3-oxo-C12-HSL (Fig. 4d, e). The supernatants of NRPS mutant cultures were capable of inducing the biosensor *lux*-transcriptional fusion in the medium lacking of 3-oxo-C12-HSL, showing similar levels of luminescence with respect to the PAO1 WT strain in the $\Delta pvdI$, $\Delta ambB$, $\Delta ambE$ and $\Delta pchE$ mutants, and decreased levels of luminescence (around 50%) in the $\Delta pvdL$, $\Delta pvdJ$, $\Delta PA3327$, $\Delta PA4078$, and $\Delta pchF$ mutants (Fig. 4e). These results indicate that mutation in the putative NRPSs differentially

affected the QS-AHL response, suggesting that the CDPs: cyclo(L-Pro-L-Tyr) and cyclo(L-Pro-L-Val), produced in high concentrations by *P. aeruginosa* PAO1 WT strain, and in diverse proportion in the NRPS mutants, which in turn antagonized the QS response mediated by 3-oxo-C12-HSL/LasR and IQS/IqsR systems.

Molecular Modeling of *P. aeruginosa* LasR Regulator with the CDPs

The antagonistic effect of the CDPs on the QS-LasR-dependent system in *P. aeruginosa* PAO1 suggested its molecular interaction with LasR transcriptional regulator. We evaluated whether CDPs could act as AHL signal mimics of the LasR protein using an in silico molecular coupling modeling, in which the crystal structure of LasR with its 3-oxo-C12-HSL ligand was compared with three CDPs (Fig. 5a, b). These analyses showed that the 3-oxo-C12-HSL-interaction site in LasR regulator occurred in a well-defined pocket, interacting with the Ser129, Asp73, and Trp60 residues (Fig. 5b). The CDPs coupled with high scores into the AHL-binding cavity of the LasR regulator, with a binding energy near the range of re-docked 3-oxo-C12-HSL-LasR [HSL = -7.3 kcal/mol; cyclo(L-Pro-L-Tyr) = -5.9 kcal/mol, cyclo(L-Pro-L-Val) = -5.8 kcal/mol and cyclo(L-Pro-L-Phe) = -7.8 kcal/mol]. Also, the dimension of the grid from

Fig. 5 Molecular docking of *P. aeruginosa* CDPs in the LasR-3-oxo-C12-HSL transcriptional regulator. **a** Chemical structures of inducers obtained from *P. aeruginosa* involved in QS systems: 3-oxo-C12-HSL (LasR inducer), C4-HSL (RhIR inducer), PQS (PqsR inducer), and IQS (IqsR inducer). *pC-HSL* denotes *p*-coumaroyl-homoserine lactone inducer of the RpaR regulator from *R. palustris* [30]. CDPs produced by *P. aeruginosa* PAO1 [17]: cyclo(L-Pro-L-Tyr), cyclo(L-Pro-L-Val), and cyclo(L-Pro-L-Phe). **b** Docking models for the structural position of 3-oxo-C12-HSL (blue; PDB ID: 1OHN) and CDPs (yellow) in the LasR-binding cavity (PDB ID: 3IX3); close-up of the CDP molecules superimposition in the binding site of LasR with its 3-oxo-C12-HSL ligand



the *P. aeruginosa* LasR protein structure with the 3-oxo-C12-HSL and the CDPs was similar (≈ 1 Å) (Fig. 5b).

Effect of Mutation in the Putative NRPS of *P. aeruginosa* on Growth and Root Development in *A. thaliana* Seedlings

CDPs may affect the cross-kingdom signaling between *P. aeruginosa* and plants acting as inducers of auxin signaling [17]. We tested the in vivo effects of the WT and putative *P. aeruginosa* NRPS mutants on the plant growth and root system architecture. We first co-cultivated 6-day-old *Arabidopsis* seedlings grown on agar plates containing MS (0.2 \times) medium with a streak of bacteria at a 5-cm distance from the primary root tip, and after 8 days of growth, root architecture parameters were determined. As previously described [17], the *P. aeruginosa lasI-rhlI* double mutant

exhibited lesser repressing effect on the growth of primary roots, when compared to the *P. aeruginosa* PAO1 WT strain, whose inoculation is deleterious to plants (Figs. 6 and 7). Interestingly, the $\Delta pvdJ$, $\Delta ambB$, and $\Delta pchE$ mutants showed primary root lengths (PRL) similar to the double mutant *lasI-rhlI* (Fig. 7a). The number of LR was stimulated in similar proportion in response to inoculation with most of the mutants when compared to plants without bacteria, and a slight increment in LR was observed in the $\Delta PA4078$ and $\Delta pchE$ mutants (Fig. 7b). LR density values was decreased in the $\Delta lasI-\Delta rhlI$, $\Delta pvdJ$, and $\Delta ambB$ strains, suggesting that some factors independent of QS were altering the bacterial sensing by the roots (Fig. 7c).

In a second set of experiments, we analyzed the growth and development of *Arabidopsis* roots in direct contact with a bacterial streak for several days. In this assay, most

Fig. 6 Effect of co-inoculation of *A. thaliana* with *P. aeruginosa* WT and NRPS mutants on root development. **a** Four-day-old *Arabidopsis* seedlings were inoculated with *Pseudomonas* strains at 5 cm distance from the primary root tip and grown for an additional 8-day period. Pictures represent the axenically grown *Arabidopsis* seedlings or seedlings co-inoculated with *P. aeruginosa* PAO1 mutants. **b** Pictures represent the *Arabidopsis* root hair development in interaction with selected the *P. aeruginosa* PAO1 mutants. The experiment was repeated three times with similar results

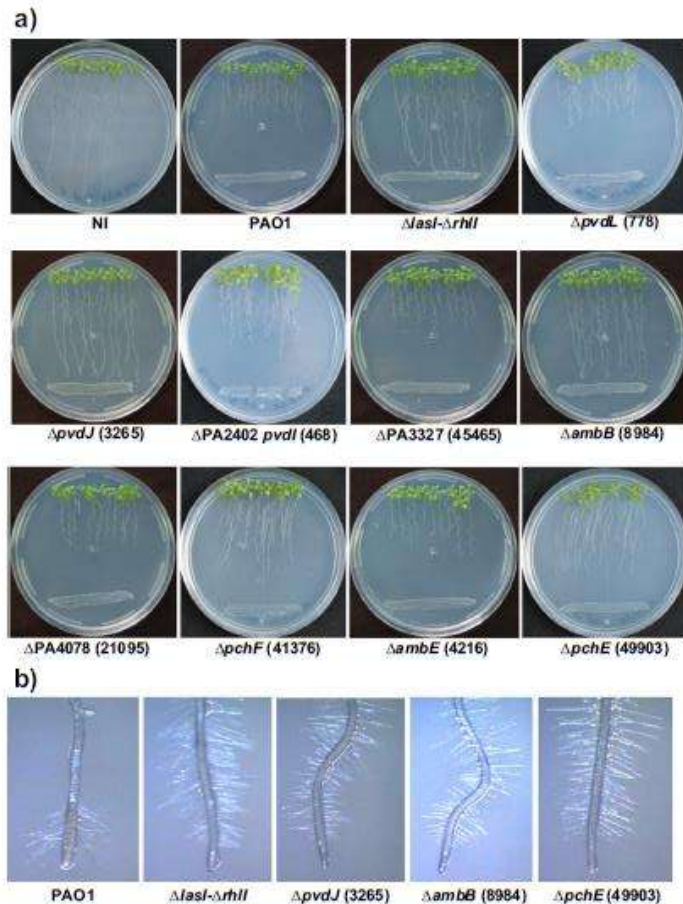
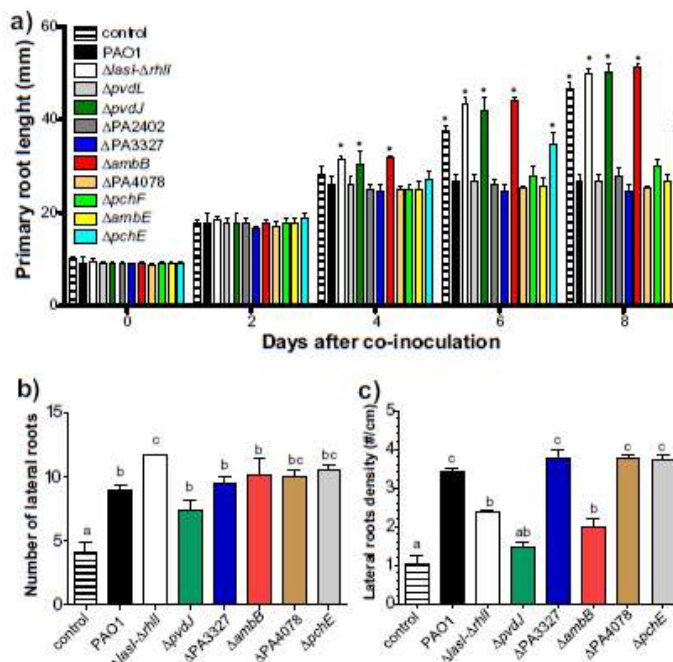


Fig. 7 Effect of bacteria on *Arabidopsis* root architecture with function of time. **a** Effect on primary root growth. **b** Effect on lateral root number per plant. **c** Effect on lateral root density (number of lateral roots per cm of primary root). Data points in all treatments represent mean \pm SD (standard deviation) ($n = 30$). These analyses were repeated three times with similar results. One-way ANOVA analysis was carried out, with Bonferroni post-hoc test, values for SD ($P < 0.05$) with respect to control are shown with asterisks. Tukey's post-hoc test, values for SD ($P < 0.05$) are shown in lowercase letters



P. aeruginosa mutants affected the growth of *Arabidopsis* similar to the WT strain. An exception was the $\Delta pvdJ$ mutant, which behaved similarly to the *lasi-rhII* double mutant and promoted plant growth by inducing LR formation (Fig. 8a–d).

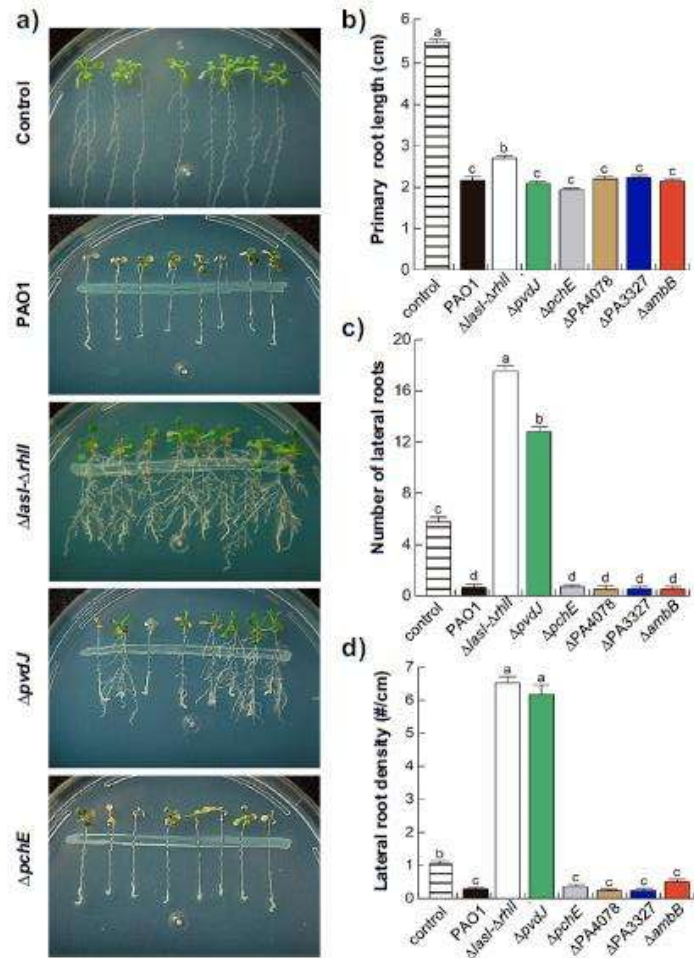
Discussion

CDPs are compounds with diverse biological activities and current knowledge points to their key role in bacteria-plant interaction [17]. In this study, we aimed at identifying proteins in the *P. aeruginosa* PAO1 genome, with roles in CDP synthesis, by using reported NRPS sequences. The NRPS sequences matched with the proteins involved in the synthesis of pyoverdine (PvdD, PvdJ, PvdI, and PvdL), pyochelin (PchF and PchE), AMB/IQS quorum-sensing molecule (AmbB and AmbE), and two hypothetical proteins with unknown functions (PA3327 and PA4078). The synthesis of pyoverdine, a chromo-peptide, and pyochelin, a siderophore with a 2-hydroxyphenyl-thiazolanyl-thiazolidine scaffold, increased under iron-limiting conditions. The latter is involved in the chelation of metals such as Fe(III), Cu(II), and Zn(II), and is considered as a virulence factor contributing to *P. aeruginosa* pathogenesis. Mutations in the *pchE* and *pchF* genes disrupt pyochelin synthesis as well as the production of the dihydroaeruginic acid, the precursor of aeruginic acid,

aeruginaldehyde, and aeruginol [31]. The $\Delta pchF$ and $\Delta pchE$ mutants were mainly defective in the production of cyclo(L-Pro-L-Val), cyclo(L-Pro-L-Leu), and cyclo(L-Pro-L-Tyr). This observation indicated that the corresponding WT proteins participated in the synthesis of CDPs, along with their proposed role in pyochelin siderophore biosynthesis. The sequence analysis showed that the PchE and PchF proteins were NRPS comprising a single module of domains, which could preferentially bind L-Pro as the scaffold residue, and subsequently incorporate it with more relaxed substrate specificity to either L-Val or L-Leu, as occurs in the dimodular NRPS AusA in *S. aureus* [32]. Our findings also indicate that other NRPS already existed in the *P. aeruginosa* PAO1 genome, since the $\Delta pchE$ and $\Delta pchF$ mutants were capable of producing cyclo(L-Pro-L-Phe), similar to the levels produced by the WT strain.

The *pvd* gene cluster plays a role in the biosynthesis of pyoverdine, and the *pvdD*, *pvdJ*, and *pvdI* gene mutations abolish the synthesis of this molecule [33]. In the $\Delta pvdJ$ mutant, the transposon disrupts the open reading frame of the gene; it is possible that in the incomplete enzyme generated, some modules might still have activity and the CDPs could be produced prematurely through siderophore synthesis, and in consequence, the CDP cyclo(L-Pro-L-Tyr) could be accumulating as a by-product. This hypothesis is supported by the fact that pyoverdine, which consists of a chromophore group

Fig. 8 Effect of direct contact co-cultivation of *A. thaliana* with *P. aeruginosa* WT and NRPS mutant strains on plant growth. Six-day-old *A. thaliana* seedlings were co-cultivated in direct contact with *P. aeruginosa* WT or mutants defective in the HSL synthases: RhlI/LasI or putative NRPS mutants and grown for 8 days. **a** Pictures represent the plates for each treatment. **b** Quantitative data about the primary root growth; **c** lateral root number; and **d** lateral root density. Data points at all treatments represent mean \pm SD ($n = 30$). Different letters indicate means, which were statistically different at $P < 0.05$. This experiment was repeated three times with similar results



attached to a variable peptide chain, comprises around 6–12 amino acids that are specific for each *Pseudomonas* species, and for which the peptide might be first synthesized before the chromophore assembly [34]. Another possibility involves an increased availability of substrates (amino acids) in the mutant for CDPs biosynthesis by another NRPS. Mutagenesis in the PA3327 and PA4078 genes also lead to an increased production of the CDPs: cyclo(L-Pro-L-Tyr) and cyclo(L-Pro-L-Phe), which might be explained by an increased availability of substrates in these mutants.

Some CDPs can act as QS-inhibitors since cyclo(L-Pro-L-Phe) inhibited bioluminescence in *Vibrio fischeri* [15], and cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Tyr-L-Pro) interfered with the *Staphylococcal* QS-system *agr*, a key regulator of virulence genes, and repressed the expression of TSST-1 in *S. aureus* [35]. In this work, we found that mutation in the

putative NRPS did not affect the production of violacein in the biosensor strain CV026, or the virulence factor elastase, but it increased the pyocyanin production in the *P. aeruginosa* Δ pvdJ mutant. These results indicate that the CDPs produced in increased or decreased physiological amounts in the *P. aeruginosa* NRPS mutants failed to interfere with AHL signaling. A library of synthetic CDPs evaluated for assessing the ability to modulate LuxR-type QS showed that cyclo(L-Pro-L-Val), cyclo(L-Pro-L-Leu), cyclo(L-Pro-L-Phe), and cyclo(L-Pro-L-Tyr) could partially inhibit the biosensor LuxR [15]. Our system of using *P. aeruginosa* PAO1 strain for the experiment was in agreement with the previous report, as we found the mechanism of interference of the CDPs with the AHL-mediated QS occurred at high concentrations (greater than 100 μ M), and the cyclo(L-Pro-L-Val) and cyclo(L-Pro-L-Tyr) were capable

of significantly inhibiting the luminescence of the LasR-dependent biosensor. This finding suggested that some CDPs could bind to the QS-dependent 3-oxo-C12-HSL/LasR protein. Molecular modeling analyses further revealed similar conformational cluster for the CDPs and the 3-oxo-C12-HSL ligand in its binding pocket of the LasR regulator. In addition, their structural analogies with QS-ligands, such as 3-oxo-C12-HSL, C4-HSL, PQS, IQS, and p-coumaroyl-L-homoserine lactone (pC-HSL) from *Rhodospseudomonas palustris* [30], might explain the suggested agonistic/antagonistic QS activities of CDPs.

During bacteria-plant interactions, several *Pseudomonas* species have the ability to colonize the rhizosphere (i.e., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aureofaciens*, and *Pseudomonas chloraphilis*), where they can act as plant-beneficial bacteria by antagonizing pathogens or through the production of compounds that influence plant-disease resistance and growth [3, 36]. Root growth is very sensitive to bacterial metabolites, including the plant hormone auxin, AHLs, pyocyanin, and CDPs [21, 37]. When analyzing the interaction between the *Arabidopsis* seedlings and *P. aeruginosa* PAO1 WT and mutants defective in AHL synthase *lasI*, it was found that the inhibition of primary root growth was correlated with production of C12-HSL, as *P. aeruginosa lasI/rhlI* double mutant defective in C12-HSL/C4-HSL synthesis did not inhibit primary root growth. However, in this mutant, the abundant induction of LR was associated with an increased production of cyclo(L-Pro-L-Tyr), cyclo(L-Pro-L-Phe), and cyclo(L-Pro-L-Val) [17]. The current data suggested that the most effective bacteria promoting plant growth produced higher amounts of CDPs, which directly shaped root architecture, since $\Delta ambB$ and $\Delta pvdJ$ mutants, which produced an increased number of LRs, were the strains that produce the highest levels of the CDPs: cyclo(L-Pro-L-Phe) and cyclo(L-Pro-L-Tyr). Although the $\Delta pvdJ$ mutant is still pathogenic, the co-cultivation assay in which roots are grown in direct contact with the bacterial streak showed an induction of LR formation, which is also consistent with its increased levels of pyocyanin, a compound previously reported to promote LR formation [21]. To our knowledge, this is the first report that explores the complexity of CDP biosynthesis in *P. aeruginosa*, indicating that multiple pathways contribute to the CDP pool in bacterial exudates. Understanding QS signaling and CDPs biosynthesis could be a promising strategy to obtain new bacterial strains in order to establish beneficial relationship with plants by means of cell-to-cell communication.

Acknowledgments This study was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) of México (grant number 256119), the Marcos Moshinsky Foundation, and Universidad Michoacana de San

Nicolás de Hidalgo/C.I.C.2.14 grant. Omar Gonzalez received a scholarship from CONACYT.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Battle SE, Meyer F, Rello J, Kung VL, Hauser AR (2008) Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *J Bacteriol* 190(21):7130–7140. doi:10.1128/jb.00785-08
- de Abreu PM, Farias PG, Paiva GS, Almeida AM, Momis PV (2014) Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard. *BMC Microbiol* 14:118. doi:10.1186/1471-2180-14-118
- Venturi V (2006) Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol Rev* 30(2):274–291. doi:10.1111/j.1574-6976.2005.00012.x
- Lee J, Zhang L (2015) The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell* 6(1):26–41. doi:10.1007/s13238-014-0100-x
- Dandekar AA, Greenberg EP (2013) Microbiology: plan B for quorum sensing. *Nat Chem Biol* 9(5):292–293. doi:10.1038/nchembio.1233
- de Kievit TR, Iglewski BH (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 68(9):4839–4849
- Fuqua C, Greenberg EP (2002) Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9):685–695
- Gallagher LA, McKnight SL, Kuznetsova MS, Pesci EC, Manoil C (2002) Functions required for extracellular quinolone signaling by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 184(23):6472–6480
- 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. *Nat Chem Biol* 9(5):339–343. doi:10.1038/nchembio.1225
- Rojas Murcia N, Lee X, Waridel P, Maspoli A, Imker HJ, Chai T, Walsh CT, Reimmann 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. *Front Microbiol* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00170
- Seguin J, Moutiez M, Li Y, Belin P, Lecoq A, Fonvielle M, Charbonnier JB, Parnodet JL, Gondy M (2011) Nonribosomal peptide synthesis in animals: the cyclodipeptide synthase of *Nematostella*. *Chem Biol* 18(11):1362–1368. doi:10.1016/j.chembiol.2011.09.010
- Bonnefond L, Arai T, Sakaguchi Y, Suzuki T, Ishitani R, Nureki O (2011) Structural basis for nonribosomal peptide synthesis by an aminoacyl-tRNA synthetase paralog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(10):3912–3917. doi:10.1073/pnas.1019480108
- Miller BR, Gulick AM (2016) Structural biology of nonribosomal peptide synthetases. *Methods Mol Biol* 1401:3–29. doi:10.1007/978-1-4939-3375-4_1
- Reimer JM, Aloise MN, Harrison PM, Schmeing TM (2016) Synthetic cycle of the initiation module of a formylating

- nonribosomal peptide synthetase. *Nature* 529(7585):239–242. doi:10.1038/nature16503
15. Campbell J, Lin Q, Geske GD, Blackwell HE (2009) New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chem Biol* 4(12):1051–1059. doi:10.1021/cb900165y
 16. Galloway WRJD, Hodgkinson JT, Bowden SD, Welch M, Spring DR (2011) Quorum sensing in gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev* 111(1):28–67. doi:10.1021/cr100109t
 17. Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Río RE, Campos-García J, López-Bucio J (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(17):7253–7258. doi:10.1073/pnas.1006740108
 18. Li LL, Malone JE, Iglewski BH (2007) Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. *J Bacteriol* 189(12):4367–4374. doi:10.1128/jb.00007-07
 19. Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, Chun-Rong L, Guenther D, Bovee D, Olson MV, Manoil C (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(24):14339–14344. doi:10.1073/pnas.2036282100
 20. McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GS, Williams P (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143(Pt 12):3703–3711. doi:10.1099/00221287-143-12-3703
 21. Ortiz-Castro R, Pelagio-Flores R, Pelagio-Flores R, Mendez-Bravo A, Mendez-Bravo A, Ruiz-Henera LF, Campos-García J, Lopez-Bucio J (2014) Pyocyanin, a virulence factor produced by *Pseudomonas aeruginosa*, alters root development through reactive oxygen species and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* 27(4):364–378. doi:10.1094/MPMI-08-13-0219-R
 22. Kohler T, Ouertatani-Sakouhi H, Cosson P, van Delden C (2014) QsrO a novel regulator of quorum-sensing and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 9(2):e87814. doi:10.1371/journal.pone.0087814
 23. Winson MK, Swift S, Fish L, Throup JP, Jorgensen F, Chhabra SR, Bycroft BW, Williams P, Stewart GS (1998) Construction and analysis of luxCDABE-based plasmid sensors for investigating N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett* 163(2):185–192
 24. Wyatt MA, Wang W, Roux CM, Beasley FC, Heinrichs DE, Dunman PM, Magarvey NA (2010) *Staphylococcus aureus* nonribosomal peptide secondary metabolites regulate virulence. *Science* 329(5989):294–296. doi:10.1126/science.1188888
 25. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30(16):2785–2791. doi:10.1002/jcc.21256
 26. Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA, Baker NA (2004) PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res* 32:W665–W667. doi:10.1093/nar/gkh381
 27. Sauguet L, Moutiez M, Li Y, Belin P, Seguin J, Le Du MH, Thai R, Masson C, Fonville M, Pernodet JL, Charbonnier JB, Gondry M (2011) Cyclodipeptide synthases, a family of class-I aminoacyl-tRNA synthetase-like enzymes involved in non-ribosomal peptide synthesis. *Nucleic Acids Res* 39(10):4475–4489. doi:10.1093/nar/gkr027
 28. Gondry M, Sauguet L, Belin P, Thai R, Amouroux R, Tellier C, Tuphile K, Jacquet M, Braud S, Courcon M, Masson C, Dubois S, Lautru S, Lecoq A, Hashimoto S, Genet R, Pemodet JL (2009) Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nat Chem Biol* 5(6):414–420. doi:10.1038/nchembio.175
 29. James ED, Knackley B, Alqahtani N, Porwal S, Ban J, Karty JA, Viswanathan R, Lane AL (2015) Two distinct cyclodipeptide synthases from a marine actinomycete catalyze biosynthesis of the same diketopiperazine natural product. *ACS Synth Biol*. doi:10.1021/acssynbio.5b00120
 30. Hirakawa H, Oda Y, Phattarasukol S, Armour CD, Castle JC, Raymond CK, Lappala CR, Schaefer AL, Harwood CS, Greenberg EP (2011) Activity of the *Rhodospseudomonas palustris* p-coumaroyl-homoserine lactone-responsive transcription factor RpaR. *J Bacteriol* 193(10):2598–2607. doi:10.1128/jb.01479-10
 31. Ye L, Cornelis P, Cornelis P, Guillemyn K, Guillemyn K, Ballet S, Ballet S, Hammerich O (2014) Structure revision of N-mercapto-4-formylcarboxystyryl produced by *Pseudomonas fluorescens* G308 to 2-(2-hydroxyphenylthiazole-4-carbaldehyde [aeruginaldehyde]. *Nat Prod Commun* 9(6):789–794 (1934-578X)
 32. Wilson DJ, Shi C, Teitelbaum AM, Gulick AM, Aldrich CC (2013) Characterization of AusA: a dimodular nonribosomal peptide synthetase responsible for the production of aureusimine pyrazinones. *Biochemistry* 52(5):926–937. doi:10.1021/bi301330q
 33. Lamont IL, Martin LW (2003) Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 149(4):833–842. doi:10.1099/mic.0.26085-0
 34. Ravel J, Cornelis P (2003) Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol* 11(5):195–200
 35. Li J, Wang W, Xu SX, Magarvey NA, McCormick JK (2011) *Lactobacillus reuteri*-produced cyclic dipeptides quench agr-mediated expression of toxic shock syndrome toxin1 in staphylococci. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(8):3360–3365. doi:10.1073/pnas.1017431108
 36. Rampioni G, Pustelny C, Fletcher MP, Wright VJ, Bruce M, Rumbaugh KP, Heeb S, Cámara M, Williams P (2010) Transcriptomic analysis reveals a global alkyl-quinolone-independent regulatory role for PqsE in facilitating the environmental adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to plant and animal hosts. *Environ Microbiol* 12(6):1659–1673. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02214.x
 37. Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, Lopez-Bucio J (2008) N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 31(10):1497–1509. doi:10.1111/j.1365-3040.2008.01863.x

LA CIENCIA EN POCAS PALABRAS

Quorum sensing o percepción del *quorum*

Omar González López y Homero Reyes de la Cruz



M.C. Omar González López es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas opción Biología Experimental, Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
omargon86@gmail.com

D.C. Homero Reyes de la Cruz es Profesor e Investigador del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
delacruz@umich.mx

¿Qué es el *quorum sensing*?

La palabra "quórum" proviene del latín "*quorum*", que es el número de individuos necesario para tomar una decisión determinada y cuyo uso principal se ha referido a la política; por otro lado "*sensing*", proviene del inglés "*sense*" y significa "detección" o "percepción", por lo que podemos decir que el "*quorum sensing*" se interpreta como la detección de un determinado número de individuos. Entonces en términos biológicos el "*quorum sensing*" es la percepción de cuórum o autoinducción de una población de bacterias que regula su comportamiento dependiente de la densidad poblacional.

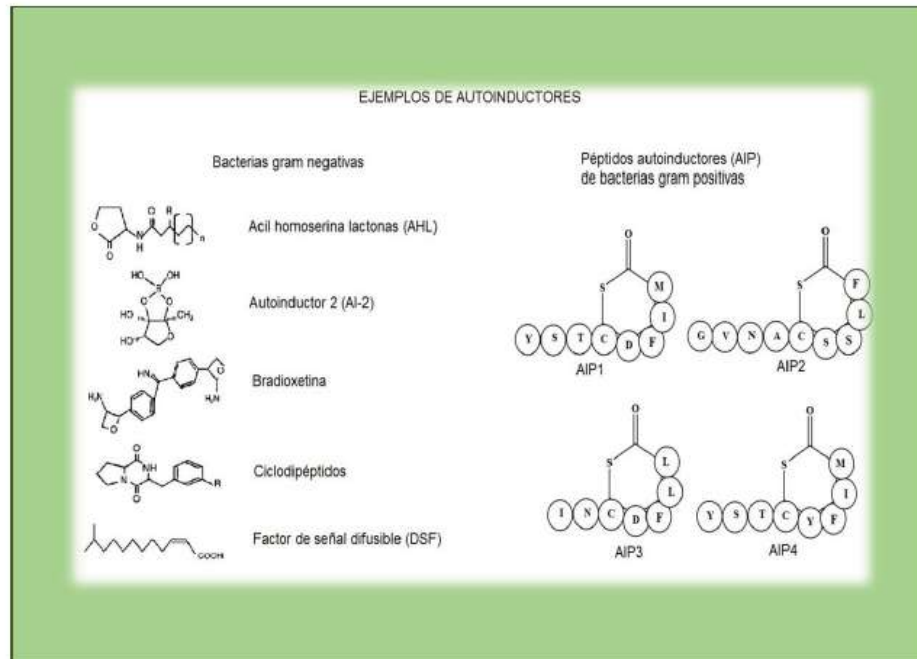
Las bacterias y otros microorganismos ¿se pueden comunicar entre sí?

Ahora sabemos que las bacterias forman comunidades llamadas colonias y que algunas presentan un estilo de vida libre, también hay simbióticas porque se asocian a un organismo sin causar daño, y otras son patógenas, porque causan infecciones a diversos organismos como las plantas. Con diversas investigaciones se determinó que las bacterias no actúan de manera independiente, que las asociaciones que ellas hacen no solo dependen de la disponibilidad de nutrientes, sino que su poder de infección se ha relacionado con la densidad de población, es decir, que generan una infección en un organismo o tejido hasta que alcanzan un cierto número de bacterias. Es por ello, que este comportamiento bacteriano generó varias preguntas, ¿cómo saben los individuos de una colonia cuando tienen un número suficiente para realizar una infección? ¿los individuos actúan de manera aislada o actúan de manera coordinada? Estas interrogantes solo se

pueden responder si las bacterias cuentan con un mecanismo de comunicación, que les permita percibir la cantidad de los miembros de su población (densidad poblacional) y de esta manera realizar acciones de manera coordinada. Este mecanismo de comunicación fue descubierto hace tres décadas y se denomina "quorum sensing" (ver *Saber Más* 34:31-32).

¿Cómo se lleva a cabo el "quorum sensing"?

La comunicación entre bacterias se produce a través de moléculas químicas que sirven como señal, también llamadas "autoinductores", que son muy variadas y su estructura depende de la especie bacteriana que los produce. En ciertas condiciones, una célula bacteriana los produce y libera a su entorno, a medida que aumenta la densidad poblacional, también incrementa la cantidad de señales, hasta que éstas sobrepasan un límite, lo que lleva a activar otras vías de señalización que inducen la expresión de genes específicos, que modifican el



comportamiento de la población. De esta manera, las bacterias pueden realizar acciones de forma coordinada, por ejemplo, las relacionadas a la invasión de organismos como su movilidad y la producción de toxinas.

¿Qué tipos de "quorum sensing" existen?

Los tipos de *quorum sensing* se pueden separar en dos grandes grupos. En el primer grupo está el empleado por bacterias Gram positivas, que utilizan moléculas señal formadas por "oligopéptidos" (pequeñas cadenas formadas por aminoácidos, los bloques con los que se construyen las proteínas), cuya estructura depende de la secuencia de aminoácidos y la longitud de la cadena. Un ejemplo de bacteria que utiliza este sistema es *Staphylococcus aureus*, que es ampliamente conocida por causar enfermedades como infecciones de piel y huesos, endocarditis (infección cardíaca), intoxicación intestinal, neumonía y síndrome de shock tóxico (infección generalizada grave que puede causar la muerte). El otro grupo, las bacterias Gram negativas, utilizan una gran variedad de moléculas señal, como las acil homoserina lactonas (formadas por un anillo de lactona enlazado por una amida a una cadena acilada de 4 hasta 14 átomos de carbono), que son ampliamente estudiadas. Existen muchas otras señales que se producen, dependiendo de las condiciones ambientales de los microorganismos.

¿El "quorum sensing" se lleva a cabo sólo entre organismos de la misma especie?

El "quorum sensing" es un mecanismo de comunicación tan importante, que se considera



esencial para la supervivencia bacteriana. Como sabemos, en la naturaleza existen comunidades microbianas que coexisten en el mismo ambiente, por lo que es determinante que sean percibidos por los organismos vecinos, ya sea de la misma especie o de especies diferentes. Las bacterias deben reconocer las señales químicas producidas por las diferentes especies de su entorno, incluso hay percepción de estas moléculas señal entre organismos diferentes a las bacterias, como los hongos, las plantas e incluso animales mamíferos, que pueden reconocer las señales de las bacterias y así diferenciar si son organismos benéficos o nocivos, que les permite activar o no sus mecanismos de defensa para combatirlas. Este tipo de interacciones entre diferentes organismos se puede encontrar en los seres humanos, donde cohabitamos con una gran diversidad de microorganismos que conocemos

como la microbiota, que habita en nuestra piel y mucosas, y es necesario que nuestros tejidos detecten a estos microorganismos para saber si pueden causar algún daño o no.

Importancia de estudiar el "quorum sensing"

Las aplicaciones del estudio de "quorum sensing" son muy diversas. Por ejemplo, la producción de antibióticos está regulada por este mecanismo, entonces podemos incrementar la producción de antibióticos o incluso modificarlos para mejorarlos. O en este sentido, bloquear la comunicación entre los organismos patógenos para disminuir infecciones. Para esto se han encontrado moléculas que interfieren con la comunicación, como algunos extractos de plantas y hongos, o moléculas diseñadas artificialmente. A este proceso de interrupción del "quorum sensing" se le denomina "quorum quenching", un área de estudio relativamente nueva.



Otra aplicación, es la identificación de cepas patógenas, variaciones de una especie bacteriana que no es considerada una especie diferente. Por ejemplo, la bac-

teria *Escherichia coli* es parte de nuestra microbiota, sin embargo existen cepas de ésta, que se consideran muy peligrosas por su patogenicidad, como la *E. coli* O157:H7, que responde de manera rápida a pequeñas cantidades de moléculas señal.

Aunque el "quorum sensing" fue descubierto recientemente, es un mecanismo ancestral y determinante en la selección y evolución de los microorganismos, por lo que es esencial su estudio para comprender la construcción de nuestro ecosistema actual.



Rojas-Badía M.M. (2011). Quorum sensing en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2):135-143. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/27959/38328>

Marquina-Díaz D. y Santos de la Sen A. (2010). Sistemas de quorum sensing en bacterias. *Reduca (Biología). Serie Microbiología*, 3(5):39-55. <http://revistareduca.es/index.php/biologia/arti->

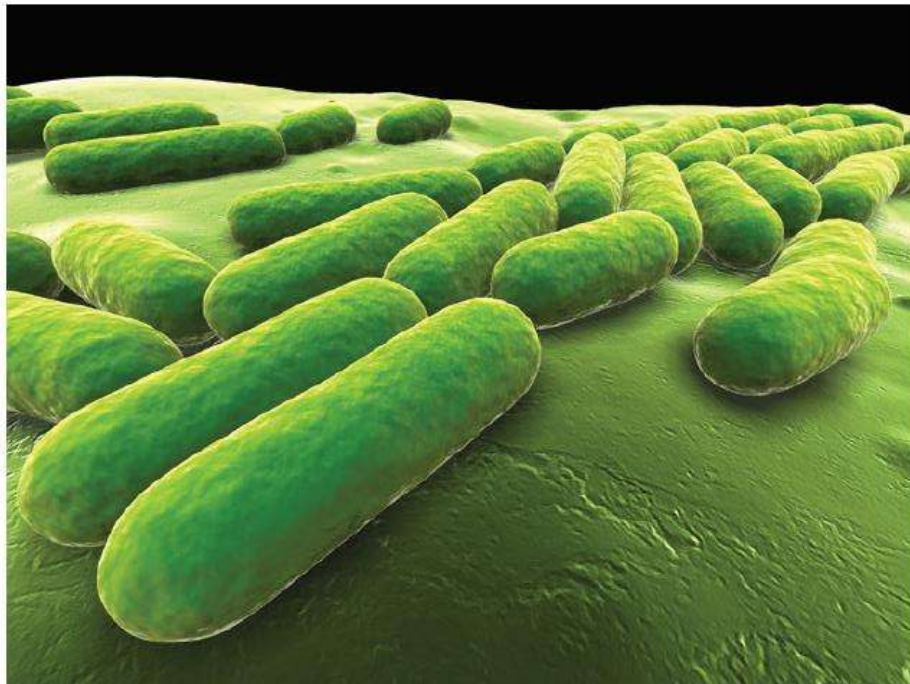
[cle/view/820/835](http://revistareduca.es/index.php/biologia/articulo/view/820/835)

Flores-Encarnación M., Aguilar-Gutiérrez G.R., Cabrera-Maldonado C., Guzmán-Flores J.E. y Flores-Encarnación M.S. (2011). El impacto biológico de los autoinductores bacterianos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(2):104-111. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000200005

ARTÍCULO

Una bacteria "mala" que también es "buena"

Omar González López



*M. en C. Omar González López, estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Opción en Biología Experimental, adscrito al Laboratorio de Control Traduccional del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
omargon86@gmail.com*

Cuando escuchamos el término "bacteria" sabemos que se refiere a organismos microscópicos que tienen como característica general que no cuentan con un núcleo que contenga el material genético. Estos microorganismos han sido ampliamente estudiados, pero el conocimiento general se ha centrado casi exclusivamente a los efectos negativos que producen en los seres vivos, como son las enfermedades que producen. Pero las bacterias también pueden ser usadas para obtener un beneficio. Por lo que para su estudio comúnmente se han separado en dos tipos: las patógenas o "malas" como aquellas que son responsables de

causar enfermedades; y las benéficas o "buenas" como las utilizadas en la industria alimenticia para la elaboración de cerveza, bebidas y productos lácteos. Aquí te presento ejemplos muy claros de las bacterias "buenas".

Bacterias en la industria alimenticia

En el sector de elaboración de alimentos es quizá donde más requerimos de la ayuda de microorganismos como las bacterias para transformar las materias primas en productos alimenticios, por ejemplo: los productos fermentados como yogurt, vinos y quesos. Estos microorganismos son sumamente importantes para diversificar y enriquecer la alimentación de la población, ya que pueden mejorar las propiedades alimenticias, el sabor o prolongar el tiempo de almacenamiento. Pero también es un área delicada cuando estos productos alimenticios se han contaminado con bacterias indeseadas, provocando la descomposición de los alimentos o produciendo sustancias tóxicas que al ser ingeridas provocan daño.

Importancia en el área clínica

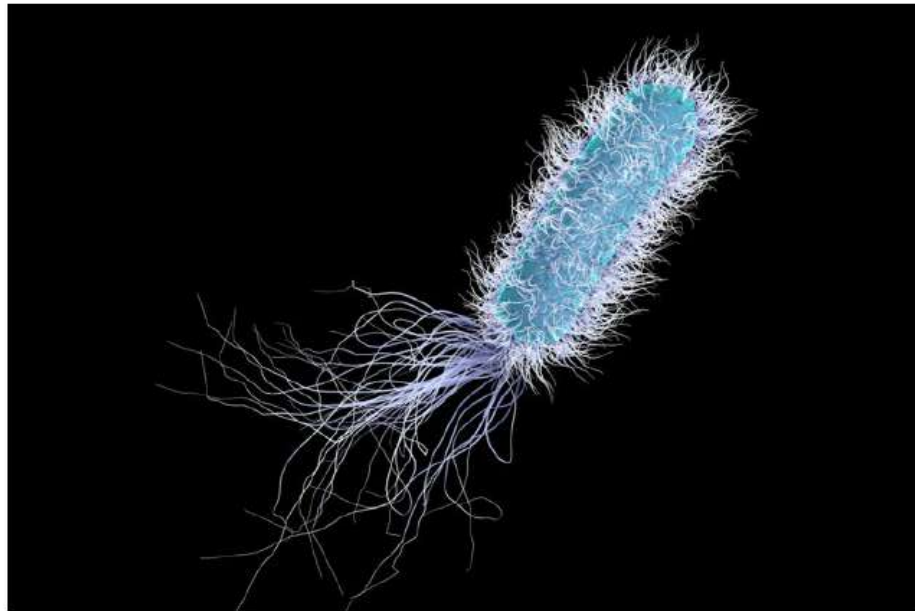
En el área clínica se han realizado un sinfín de investigaciones de los daños provocados por bacterias causantes de enfermedades y como combatir-

las o contrarrestar los efectos dañinos provocados. Algunas de las enfermedades más importantes por su importancia epidemiológica podemos mencionar a la tuberculosis, neumonía, meningitis, gonorrea, cólera, infecciones intestinales, entre muchas otras. Pero también se emplean bacterias con efectos positivos sobre la salud, como lo es el uso de probióticos que mejoran el funcionamiento intestinal, protegen las mucosas intestinales, previenen infecciones urinarias o ayudan a fortalecer el sistema inmune.

También se pueden usar para aislar compuestos benéficos como los diferentes antibióticos producidos por bacterias que se han empleado para combatir enfermedades causadas por otras bacterias y hongos. Aunque lamentablemente se ha abusado del uso de los antibióticos y actualmente esto ha provocado organismos resistentes a los antibióticos más empleados, aún se buscan nuevos antibióticos y otros tipos de compuestos efectivos que las bacterias pueden brindarnos.

Uso de bacterias en el cuidado del medio ambiente

Parece raro asociar el cuidado del medio ambiente con el uso de bacterias, ya que se les considera como contaminantes del ambiente, pero al





estudiar ciertas propiedades especiales, se pueden aplicar de forma muy interesante. Por ejemplo, se están empleando bacterias capaces de producir bioplásticos que tienen la ventaja de auto degradarse en un tiempo mucho menor que su contraparte, como lo son los plásticos sintéticos, que incluso tardan cientos de años en degradarse.

Otros microorganismos se han estudiado por su capacidad de degradar compuestos contaminantes que usan como fuente de alimentación, como los generados en derrames de petróleo y otros compuestos tóxicos generados por prácticas industriales, que contaminan suelos y aguas. De esta manera, las bacterias potencialmente pueden mediar los daños causados al medio ambiente, que son muy difíciles de limpiar por otros métodos.

Empleo de bacterias en el área agrícola

Las bacterias conocidas como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) se han usado ampliamente en diversos cultivos para favorecer el crecimiento de plantas e incrementar la producción de alimentos. Estas bacterias son obtenidas del suelo por presentar propiedades como la fijación de nitrógeno, la producción de hormonas vegetales y otros compuestos favorables para el crecimiento de plantas,

y algunas especies son capaces de eliminar otros microorganismos patógenos causantes de enfermedades en raíz, hojas, tallos, flores y frutos. Este tipo de bacterias PGPR son útiles para aumentar la producción agrícola y se buscan debido a que tienen grandes ventajas en el medio ambiente, a diferencia del impacto negativo que causa el uso excesivo de agroquímicos fertilizantes y plaguicidas. Actualmente se continúan aislando y estudiando bacterias desconocidas y su posible aplicación por esta razón, en diferentes y muy variados ámbitos... Entonces

¿Es un buen sistema clasificar a las bacterias en buenas o malas?

Como se mencionó anteriormente, las bacterias se pueden separar en "buenas" o "malas"; pero no siempre se cumple con esta clasificación, un ejemplo de esto es la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, que se conoce por ser un agente patógeno o sea que causa enfermedades como infecciones en pacientes con cáncer, trasplantados, quemados y fibrosis cística, y que en años recientes ha atraído la atención como agente causal de infecciones hospitalarias resistentes a múltiples antibióticos, que también se les ha llamado "súper bacterias".

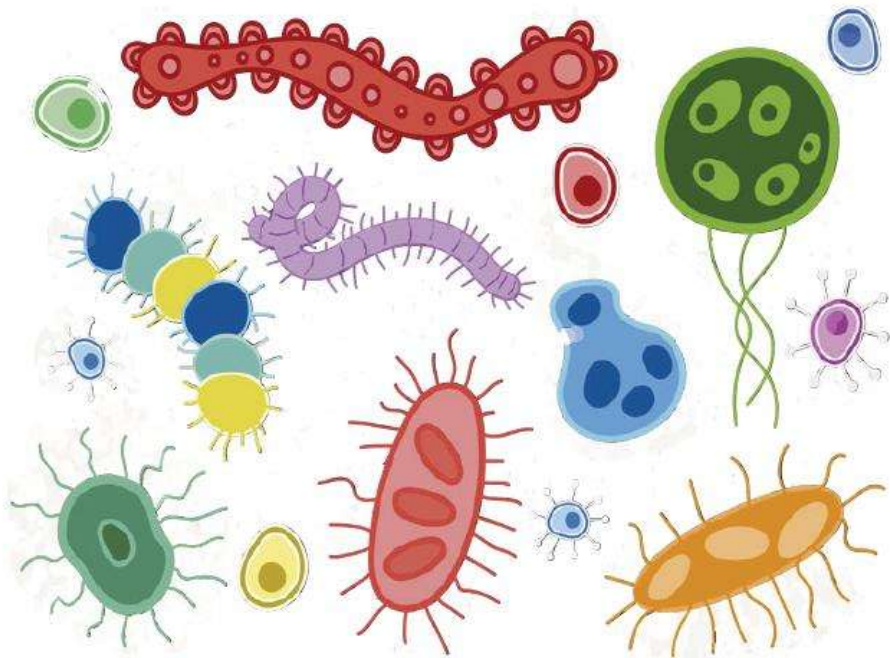
Sin embargo, compuestos producidos por esta bacteria, conocidos como ciclodipeptidos, in-

ducen el crecimiento y desarrollo de plantas, promoviendo un mayor crecimiento por un mecanismo en el cual parecen sustituir a las hormonas naturales de plantas como son las auxinas, por lo que se podrían usar a nivel agronómico para generar cultivos con un mayor rendimiento. Estas moléculas pueden tener un papel importante para obtener una mejoría en el número y calidad de productos vegetales, necesarios para alimentar a toda la población. Además de esta propiedad, los ciclodipeptidos poseen actividad anticancerígena.

La bacteria *P. aeruginosa*, también es capaz de producir una gran variedad de compuestos

como pigmentos, bactericidas y una variedad de enzimas, con un alto potencial útil para el ser humano. Entonces, el estudio extensivo de los organismos, incluso aquellos que consideramos nocivos nos puede llevar a descubrir compuestos y propiedades de éstos que son benéficas en las distintas áreas del conocimiento. Este microorganismo es un claro ejemplo de que no cumple con la clasificación que expliqué antes...

*¿es una bacteria "buena"? O
¿es una bacteria "mala"?*



SaberMás

Daza-Pérez, R.M (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud, 22(3): 57-67. <https://www.msbs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>

Renneberg, R. (2008). Biotecnología para principiantes. Capítulo 1: Cerveza, pan, queso-suculenta

biotecnología. Editorial Reverté S.A., pp. 1-23. <https://vdocuments.mx/biotecnologia-para-principiantes-reinhard-renneberg.html>

Ortiz-Castro, R., Campos-García, J. y López-Bucio, J. (2012). Comunicación planta-bacteria basada en ciclodipeptidos de origen microbiano con actividad auxínica. Ciencia Nicolaita, 56:59-74. <https://www.cic.cn.umich.mx/index.php/cn/article/view/110>

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la siguiente discusión de resultados, se hará alusión al capítulo 1 de los resultados y el número de figuras a las que se hace referencia corresponden al número de figura asignado en dicho capítulo.

Los ciclodipeptidos han atraído la atención debido a sus importantes actividades biológicas, entre estas actividades, está la modificación de la arquitectura en plantas. Mediante un sistema de interacción *in vitro*, se demostró que mediante la producción de CDPs, *P. aeruginosa* es capaz de promover el crecimiento de *A. thaliana* (Ortiz-Castro et al., 2011). Mientras que, en el presente estudio se utilizó una mezcla de CDPs que se extrajeron del medio de cultivo de *P. aeruginosa* y se evaluó su capacidad en la promoción del crecimiento (Fig 1). Se observó que la mezcla de CDPs indujo el crecimiento y desarrollo en concentraciones de 0.1 hasta 10 µg/mL. Mientras que, a la dosis mayor que se probó de 100 µg/mL, se reprimió el crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana*. Si tomamos en cuenta el fenotipo clásico de la administración de dosis altas de auxinas, donde se reprime la longitud de la raíz primaria y se estimula el número de raíces laterales, entonces podríamos atribuir este efecto a la activación de la vía de señalización de auxinas que los CDPs son capaces de activar por interacción con el receptor de auxinas TIR1 (Ortiz-Castro et al., 2011).

El crecimiento a nivel de tejido se puede atribuir a un incremento en la proliferación y/o elongación celular. Para investigar si los CDPs son capaces de estimular la proliferación, evaluamos la expresión de *CYCB1* inducida por diferentes concentraciones de la mezcla de CDPs en plantas transgénicas de la línea *CycB1::uidA*. La proteína *CYCB1* se expresa durante la transición de la fase G2/M del ciclo celular, por lo que se puede usar como gen reportero de la división celular (Colón-Carmona et al., 1999). Se observó que la administración por 24 h de la

mezcla de CDPs a 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al medio de cultivo de las plantas reporteras incrementó la expresión del marcador en el meristemo de la raíz (Fig 2), indicando que los CDPs pueden inducir la proliferación celular. Enseguida, se probó si el incremento de la división celular se mantenía a los 8 días de tratamiento con la mezcla de CDPs, observando que a las concentraciones de 0.1 hasta 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ existe un incremento en la proliferación en el meristemo de la raíz inducido por los CDPs, excepto a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Fig S1), lo cual es consistente con el efecto en la raíz primaria previamente observado en la Fig 1. Además, se determinó la etapa de desarrollo de LRP para determinar si el incremento en el número de raíces laterales inducido por los CDPs se debe a un incremento en la maduración de LRP (Fig S1b). Con lo que se confirmó que los CDPs inducen un aumento de raíces laterales al estimular la maduración de LRP. Esto indica que el incremento en el crecimiento y desarrollo de la raíz de *A. thaliana* por los CDPs, se debe a un incremento en la proliferación celular en la raíz primaria y raíces laterales. Adicional a esto, para relacionar el efecto de los CDPs sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz con la vía de TOR, se utilizó PF-470871, un inhibidor de la proteína S6K (Pearce et al., 2010). Al utilizar PF-470871 0.16 μM , como se esperaba, disminuyó la división celular en el meristemo de la raíz. Mientras que, al administrar el inhibidor y los CDPs en conjunto, la mezcla de CDPs a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lograron reestablecer la proliferación a valores normales, indicando que se requiere una vía de TOR activa para la promoción del crecimiento inducida por los ciclodipéptidos (Fig 2b y c).

La proteína cinasa TOR se considera como el regulador maestro del crecimiento en organismos eucariontes, involucrada en las principales etapas del crecimiento y desarrollo durante el ciclo de vida de las plantas (Shi et al., 2018). Esta funciona como un sensor de las condiciones celulares y puede ser activada por diferentes estímulos internos y externos, como las auxinas (Deng et al., 2016; Turck, 2004), en una vía que involucra a la proteína G pequeña ROP2 (Schepetilnikov & Ryabova, 2017a). Como se mencionó anteriormente, los CDPs tienen una actividad tipo

auxina, por lo que determinamos si los CDPs son capaces de activar a la vía de TOR. Por este motivo, usamos plantas con una expresión reducida de TOR (*tor-es*) y se trataron con diferentes dosis de CDPs (Fig 3). Donde se observaron cambios morfológicos menores y si los comparamos con el tratamiento en plantas Col-0, podemos resaltar la importancia de la expresión TOR en el efecto promotor vegetal de los CDPs. Ya que en condiciones normales la expresión de TOR no se ve modificada, sino su activación por fosforilación. Por esta razón se determinó la activación de la vía por el cambio en la fosforilación de S6K1, un blanco directo de TOR (también llamada únicamente S6K). En la cinasa S6K, se han identificado múltiples sitios de fosforilación relevantes conservados entre mamíferos y *Arabidopsis*, siendo relevante la fosforilación en Thr-449, ya que se usa como indicador de la actividad de TOR (Rexin, Meyer et al., 2015; Turck, 2004). Donde observamos que la mezcla de CDPs incrementó la fosforilación de S6K en todas las dosis probadas en un tiempo de 2 h (Fig 4a). Después se seleccionó la dosis de 1 µg/mL para realizar un tratamiento en diferentes tiempos de 30, 60, 90 y 120 min (Fig 4b), donde se observó un incremento gradual en la fosforilación, hasta que se observa un máximo a los 90 min y una disminución de la fosforilación a los 120 min, indicando que la activación cíclica de S6K por los ciclodipéptidos. Además, para corroborar el efecto de los CDPs sobre la vía de TOR, se usó AZD8055, que es un inhibidor de TOR. Conforme a lo esperado, la aplicación de AZD8055 1 µM disminuyó la fosforilación de S6K (Fig 4c) y cuando se usó conjuntamente el inhibidor y los CDPs se vio un aumento en la fosforilación de S6K (Fig 4d), indicando que el aumento en la fosforilación S6K inducida por los CDPs se lleva a cabo a través de TOR y esta fosforilación indica un aumento en la actividad de la vía de TOR.

Arriba en el texto, se estableció que la mezcla de ciclodipéptidos obtenida del extracto del medio de cultivo de *P. aeruginosa* PAO1, indujo la promoción del crecimiento por un aumento de la proliferación celular y maduración de primordios

de raíces laterales, y que este efecto es dependiente de la actividad de la vía TOR/S6K. Por lo que, enseguida se determinó la importancia de la vía de TOR durante la interacción de *P. aeruginosa* con *A. thaliana*. Para esto, se utilizaron plántulas de *A. thaliana* Col-0 co-inoculadas con *P. aeruginosa* PAO1 (cepa silvestre) y JM2 ($\Delta lasI/\Delta rhII$) por 10 días, se usaron extractos de proteína de estas plantas y se analizaron por electroforesis 2-D, para la detección de la proteína S6K se utilizó un anticuerpo específico (Fig 6), con esto se pudo observar cambios post-traduccionales en S6K. Donde, con la co-inoculación con ambas cepas bacterianas (PAO1 y JM2) se observó un desplazamiento en la movilidad electroforética de S6K hacia el polo positivo, indicando cambios como la fosforilación que, a su vez, indica una activación de la vía de TOR. Aunque la inoculación con ambas cepas indujo un desplazamiento hacia el polo positivo, solo la inoculación con PAO1 indujo cambios en el peso molecular. Esto se puede atribuir a que *P. aeruginosa* produce otras moléculas, además de los CDPs, que pueden modificar la arquitectura radicular de *A. thaliana*, como la pioverdina y HSL, que inducen un aumento en el número de raíces laterales y el número y longitud de pelos radiculares (Ortíz-Castro et al., 2008; Ortiz-Castro et al., 2014), por lo que esta variedad de moléculas producidas por *P. aeruginosa* podrían ser los responsables de inducir diversos cambios post-traduccionales en S6K.

Previamente, Corona-Sánchez et al. (2019) determinaron la capacidad de los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* de activar a S6K en maíz (*ZmS6K*), mediante inmunodetección (Capítulo 2). Si bien es importante, en el presente trabajo determinamos la relevancia de la vía de TOR en el efecto promotor vegetal de los CDPs utilizando otro modelo de estudio. *Arabidopsis thaliana* se usa ampliamente como organismo modelo debido sus características como tamaño pequeño, ciclo de vida corto, alta producción de semillas, un genoma relativamente pequeño y completamente secuenciado, facilidad de manipular su genoma y la disponibilidad de una biblioteca de mutantes de prácticamente todos los genes (The Arabidopsis

Genome Initiative, 2000). De estas líneas modificadas de *A. thaliana* se obtuvieron y probaron las líneas sobreexpresoras de TOR (OX-TOR) y con expresión baja de TOR (tor-es) en interacción cercana con las cepas *P. aeruginosa* PAO1 y JM2 (Fig 7). Con lo que se observó que en las plántulas tor-es no se observaron cambios morfológicos significativos, contrario a lo observado con plántulas Col-0 que hubo grandes cambios morfológicos. Por el contrario, con las plántulas OX-TOR se incrementó la biomasa, comparado con las plantas control Col-0. Esto resalta la importancia de la vía de TOR en el efecto promotor inducido por los CDPs.

Ortiz-Castro et al (2011) determinaron que los CDPs son capaces de imitar a las auxinas, incluso a nivel del receptor de auxinas, por lo que los CDPs podrían activar la vía de TOR a través de ROP2, que funciona como activador de TOR en respuesta a auxinas (Schepetilnikov et al., 2014). Además, en líneas celulares cancerígenas humanas, los CDPs inducen un efecto citotóxico, donde se identificó la participación de la vía de TOR por la inhibición de la fosforilación de AKT en Ser-473 y S6K en Thr-389 (río arriba de TOR y río abajo de TOR, respectivamente) (Hernández-Padilla et al., 2017). En el presente trabajo, se determinó que los CDPs inducen la fosforilación de S6K, dependiente de TOR en *A. thaliana*, por lo que, parece importante determinar si los CDPs pueden afectar la vía de AtTOR en componentes río arriba de TOR. Aunque hasta el momento no se ha encontrado una proteína homóloga de AKT en plantas, se podría rastrear la activación de otros componentes.

VIII. CONCLUSION

Los ciclodipéptidos producidos por *P. aeruginosa* PAO1 inducen el crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de raíces laterales en *A. thaliana* de manera dependiente de la dosis, por un mecanismo que involucra la activación de la vía TOR/S6K.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atkinson, S., Williams, P. (2009). Quorum sensing and social networking in the microbial world. *Journal of The Royal Society Interface*, 6(40), 959–978. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0203>
- Bakshi, A., Moin, M., Madhav, M. S., Kirti, P. B. (2019). Target of rapamycin, a master regulator of multiple signalling pathways and a potential candidate gene for crop improvement. *Plant Biology*, 21(2), 190–205. <https://doi.org/10.1111/plb.12935>
- Belin, P., Moutiez, M., Lautru, S., Seguin, J., Pernodet, J.-L., Gondry, M. (2012). The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. *Natural Product Reports*, 29(9), 961–979. <https://doi.org/10.1039/C2NP20010D>
- Bourgeois, G., Seguin, J., Babin, M., Gondry, M., Mechulam, Y., Schmitt, E. (2020). Structural basis of the interaction between cyclodipeptide synthases and aminoacylated tRNA substrates. *Rna*, rna.075184.120. <https://doi.org/10.1261/rna.075184.120>
- Canu, N., Belin, P., Thai, R., Correia, I., Lequin, O., Seguin, J., Seguin, J., Gondry, M. (2018). Incorporation of Non-canonical Amino Acids into 2,5-Diketopiperazines by Cyclodipeptide Synthases. *Angewandte Chemie - International Edition*, 57(12), 3118–3122. <https://doi.org/10.1002/anie.201712536>
- Canu, N., Moutiez, M., Belin, P., Gondry, M. (2019). Cyclodipeptide synthases: a promising biotechnological tool for the synthesis of diverse 2,5-diketopiperazines. *Natural Product Reports*, 37, 312-321. <https://doi.org/10.1039/C9NP00036D>
- Colón-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., Doerner, P. (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin–GUS fusion protein. *The Plant Journal*, 20(4), 503–508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00620.x>
- Corona-Sánchez, I., Peña-Urbe, C. A., González-López, O., Villegas, J., Campos-García, J., Reyes de la Cruz, H. (2019). Cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* modulate the maize (*Zea mays* L.) root system and promote S6 ribosomal protein kinase activation. *PeerJ*, 7, e7494. <https://doi.org/10.7717/peerj.7494>
- de Carvalho, M. P., Abraham, W.-R. (2012). Antimicrobial and Biofilm Inhibiting Diketopiperazines. *Current Medicinal Chemistry*, 19(21), 3564–3577. <https://doi.org/10.2174/092986712801323243>

de Kievit, T. R., Iglewski, B. H. (2000). Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity*, 68(9), 4839–4849. <https://doi.org/10.1128/iai.68.9.4839-4849.2000>

Debunne, N., Janssens, Y., Van de Wiele, C., Wynendaele, E., De Spiegeleer, B., De Craemer, S., Verbeke, F. (2017). Peptides as Quorum Sensing Molecules: Measurement Techniques and Obtained Levels *In vitro* and *In vivo*. *Frontiers in Neuroscience*, 11, 183. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00183>

Dela Ahator, S., 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>

Deng, K., Yu, L., Zheng, X., Zhang, K., Wang, W., Dong, P., Zhang, J., Ren, M. (2016). Target of Rapamycin Is a Key Player for Auxin Signaling Transduction in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 291. doi: 10.3389/fpls.2016.00291

Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C., Meyer, C. (2007). The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Reports*, 8(9), 864-870. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401043>

Dobrenel, T., Caldana, C., Hanson, J., Robaglia, C., Vincentz, M., Veit, B., Meyer, C. (2016). TOR Signaling and Nutrient Sensing. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 261-285. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043014-114648>

Fenton, T. R., Gout, I. T. (2011). Functions and regulation of the 70 kDa ribosomal S6 kinases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 43(1), 47-59. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.09.018>

Gondry, M., Jacques, I. B., Thai, R., Babin, M., Canu, N., Seguin, J., Belin, P., Pernodet, J.-L., Moutiez, M. (2018). A comprehensive overview of the cyclodipeptide synthase family enriched with the characterization of 32 new enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 9(46), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00046>

Gondry, M., Sauguet, L., Belin, P., Thai, R., Amouroux, R., Tellier, C., Tuphile, K., Jacquet, M., Braud, S., Courçon, M., Masson, C., Dubois, S., Lautru, S., Lecoq, A., Hashimoto, S., Genet, R., Pernodet, J.-L. (2009). Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nature Chemical Biology*, 5(6), 414–420. <https://doi.org/10.1038/nchembio.175>

Gonzalez, J. E., Keshavan, N. D. (2006). Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 859–875. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00002-06>

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, 616-629. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0896-4>

Grünwald, J., & Marahiel, M. A. (2006). Chemoenzymatic and Template-Directed Synthesis of Bioactive Macrocyclic Peptides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 121–146. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.121-146.2006>

Haas, D., Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307–319. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1129>

Hastings, J. W., Nealson, K. H. (1977). Bacterial bioluminescence. *Annual Review of Microbiology*, 31(1), 549-595. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.31.100177.003001>

Hernández-Padilla, L., Vázquez-Rivera, D., Sánchez-Briones, L. A., Díaz-Pérez, A. L., Moreno-Rodríguez, J., Moreno-Eutimio, M. A., Meza-Carmen, V., Reyes-de la Cruz, H., Campos-García, J. (2017). The antiproliferative effect of cyclodipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 on HeLa cells involves inhibition of phosphorylation of Akt and S6k kinases. *Molecules*, 22(6), 1024. <https://doi.org/10.3390/molecules22061024>

The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796. <http://dx.doi.org/10.1038/35048692>

Jacques, I. B., Moutiez, M., Witwinowski, J., Darbon, E., Martel, C., Seguin, J. Favry, E., Thai, R., Lecoq, A., Dubois, S., Perdonet, J-L., Gondry, M., Belin, P. (2015). Analysis of 51 cyclodipeptide synthases reveals the basis for substrate specificity. *Nature Chemical Biology*, 11(9), 721–727. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1868>

Juhas, M., Eberl, L., Tümmler, B. (2005). Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology*, 7(4), 459–471. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00769.x>

Karatuna, O., Yagci, A. (2010). Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(12), 1770–1775. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03177.x>

- Martínez-Carranza, E., Ponce-Soto, G. Y., Díaz-Pérez, A. L., Cadenas, E., Souza, V., Campos-García, J. (2018). Involvement of cyclodipeptides in the competition of bacterial communities in the oligotrophic Churince aquatic system of Cuatro Ciénegas Basin dominated by Gammaproteobacteria. *Extremophiles*, 22(1), 73–85. <https://doi.org/10.1007/s00792-017-0978-3>
- Mishra, A. K., Choi, J., Choi, S. J., Baek, K. H. (2017). Cyclodipeptides: An overview of their biosynthesis and biological activity. *Molecules*, 22(10), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules22101796>
- Montané, M., Menand, B. (2019). TOR inhibitors: From mammalian outcomes to pharmacogenetics in plants and algae. *Journal of Experimental Botany*, 70(8), 2297-2312. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz053>
- Moutiez, M., Seguin, J., Fonvielle, M., Belin, P., Jacques, I. B., Favry, E., Arthur, M., Gondry, M. (2014). Specificity determinants for the two tRNA substrates of the cyclodipeptide synthase AlbC from *Streptomyces noursei*. *Nucleic Acids Research*, 42(11), 7247–7258. <https://doi.org/10.1093/nar/gku348>
- Ng, W.-L., Bassler, B. L. (2009). Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 197–222. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304>
- Nilov, D. K., Yashina, K. I., Gushchina, I. V, Zakharenko, A. L., Sukhanova, M. V, Lavrik, O. I., Š, V. K. (2018). 2, 5 Diketopiperazines: A New Class of Poly (ADP ribose) polymerase Inhibitors. *Biochemistry*. 83(2), 152–158. <https://doi.org/10.1134/S0006297918020074>
- 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 of the United States of America*, 108(17), 7253–7258. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006740108>
- Ortiz-Castro, R., Martínez-Trujillo, M., López-Bucio, J. (2008). N-acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, 31(10), 1497–1509. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01863.x>
- Ortiz-Castro, R., Pelagio-Flores, R., Méndez-Bravo, A., Ruiz-Herrera, L. F., Campos-García, J., López-Bucio, J. (2014). Pyocyanin, a Virulence Factor Produced by *Pseudomonas aeruginosa*, Alters Root Development Through Reactive Oxygen Species and Ethylene Signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(4), 364–378. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-13-0219-R>

- Pearson, J. P., Pesci, E. C., Iglewski, B. H. (1997). Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of Bacteriology*, 179(18), 5756–5767. <https://doi.org/10.1128/jb.179.18.5756-5767.1997>
- Pérez-Velázquez, J., Gölgeli, M., García-Contreras, R. (2016). Mathematical Modelling of Bacterial Quorum Sensing: A Review. *Bulletin of Mathematical Biology*, 78(8), 1585–1639. <https://doi.org/10.1007/s11538-016-0160-6>
- Plotnikova, J. M., Rahme, L. G., Ausubel, F. M. (2000). Pathogenesis of the Human Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124(4), 1766 – 1774. <https://doi.org/10.1104/pp.124.4.1766>
- Prasad, C. (1995). Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides*, 16(1), 151–164. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0196-9781\(94\)00017-Z](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0196-9781(94)00017-Z)
- Quilichini, T. D., Gao, P., Pandey, P. K., Xiang, D., Ren, M., Datla, R. (2019). A role for TOR signaling at every stage of plant life. *Journal of Experimental Botany*, 70(8), 2285–2296. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz125>
- Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G., Ausubel, F. M. (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, 268(5219), 1899–1902. <https://doi.org/10.1126/science.7604262>
- Reading, N. C., Sperandio, V. (2006). Quorum sensing: The many languages of bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 254(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00001.x>
- Rexin, D., Meyer, C., Robaglia, C., Veit, B. (2015). TOR signalling in plants. *Biochemical Journal*, 470, 1–14. <https://doi.org/10.1042/BJ20150505>
- Reyes de la Cruz, H., Aguilar, R., Sánchez de Jiménez, E. (2004). Functional Characterization of a Maize Ribosomal S6 Protein Kinase (ZmS6K), a Plant Ortholog of Metazoan p70S6K. *Biochemistry*, 43, 533–539.
- Ryabova, L. A., Robaglia, C., Meyer, C. (2019). Target of Rapamycin kinase: central regulatory hub for plant growth and metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 70(8), 2211–2216. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz108>
- Schepetilnikov, M., Makarian, J., Srour, O., Geldreich, A., Yang, Z., Chicher, J., Hammann, P., Ryabova, L. A. (2014). GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *The EMBO Journal*, 33, 1–18. <https://doi.org/10.15252/embj>
- Schepetilnikov, M., Ryabova, L. A. (2017a). Auxin Signaling in Regulation of

Plant Translation Reinitiation. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1014. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01014>

Schepetilnikov, M., Ryabova, L. A. (2017b). Recent Discoveries on the Role of TOR (Target of Rapamycin) Signaling in Translation in Plants. *Plant Physiology*, 176(2), 1095–1105. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01243>

Schuster, M., Peter Greenberg, E. (2006). A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2), 73–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.01.036>

Shi, L., Wu, Y., Sheen, J. (2018). TOR signaling in plants: conservation and innovation. *Development*, 145(13), dev160887. <https://doi.org/10.1242/dev.160887>

Shimobayashi, M., Hall, M. N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(3), 155–162. <https://doi.org/10.1038/nrm3757>

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., Westbrok-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coutler, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K.-S., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E.W., Lory, S., Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>

Tatebe, H., Shiozaki, K. (2017). Evolutionary conservation of the components in the tor signaling pathways. *Biomolecules*, 7(4), 77. <https://doi.org/10.3390/biom7040077>

Turck, F. (2004). Phytohormones Participate in an S6 Kinase Signal Transduction Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(4), 1527–1535. <https://doi.org/10.1104/pp.103.035873>

Van Dam, T. J. P., Zwartkuis, F. J. T., Bos, J. L., Snel, B. (2011). Evolution of the TOR pathway. *Journal of Molecular Evolution*, 73, 209-220. <https://doi.org/10.1007/s00239-011-9469-9>

Venturi, V., Keel, C. (2016). Signaling in the Rhizosphere. *Trends in Plant Science*, 21(3), 187–198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>

Vishwakarma, K., Kumar, N., Shandilya, C., Mohapatra, S., Bhayana, S., Varma, A. (2020). Revisiting Plant–Microbe Interactions and Microbial

Consortia Application for Enhancing Sustainable Agriculture: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 11(560406), 1-21. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.560406>

Walker, T. S., Bais, H. P., Déziel, E., Schweizer, H. P., Rahme, L. G., Fall, R., Vivanco, J. M. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation. *Plant Physiology*, 134(1), 320–331. <https://doi.org/10.1104/pp.103.027888>

Wang, X., Li, Y., Zhang, X., Lai, D., Zhou, L. (2017). Structural diversity and biological activities of the cyclodipeptides from Fungi. *Molecules*, 22(12), 2026. <https://doi.org/10.3390/molecules22122026>

Watanabe, K., Toh, Y., Suto, K., Shimizu, Y., Oka, N., Wada, T., Tomita, K. (2007). Protein-based peptide-bond formation by aminoacyl-tRNA protein transferase. *Nature*, 449(7164), 867–871. <https://doi.org/10.1038/nature06167>

Wu, Y., Shi, L., Li, L., Fu, L., Liu, Y., Xiong, Y., Sheen, J. (2019). Integration of nutrient, energy, light, and hormone signalling via TOR in plants. *Journal of Experimental Botany*, 70(8), 2227–2238. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz028>

Wyatt, M. A., Mok, M. C. Y., Junop, M., Magarvey, N. A. (2012). Heterologous Expression and Structural Characterisation of a Pyrazinone Natural Product Assembly Line. *ChemBioChem*, 13(16), 2408–2415. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200340>

Xiong, Y., Sheen, J. (2014). The Role of Target of Rapamycin Signaling Networks in Plant Growth and Metabolism. *PLANT PHYSIOLOGY*, 164, 449-512. <https://doi.org/10.1104/pp.113.229948>

Yaguchi, M., Ikeya, S., Kozaki, A. (2020). The activation mechanism of plant S6 kinase (S6K), a substrate of TOR kinase, is different from that of mammalian S6K. *FEBS Letters*, 594(4), 776–787. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13661>