



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Título:

“Efecto de la mutación en probables péptido sintasas no-ribosomales de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en la producción de ciclo-dipéptidos”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS  
OPCIÓN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

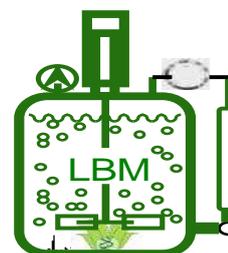
Presentado por:

Q.F.B. OMAR GONZÁLEZ LÓPEZ

Asesor:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA JESÚS CAMPOS GARCÍA

MORELIA, MICHOACÁN, ENERO 2015



## AGRADECIMIENTOS

- A mi familia, que siempre me brindaron el apoyo y cariño necesarios para lograr mis propósitos. Especialmente a mis papás que a pesar de sus diferencias siempre se unieron para darme los consejos y fortaleza necesaria. También a mi hermana Erika y mi cuñado Edgar Ruiz gracias por motivarme y apoyarme y a mi sobrinita Itzayana por la alegría que me genera al compartir el tiempo juntos.
- A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al CONACyT por el apoyo económico recibido.
- A mi asesor Jesús Campos García por haberme recibido en su laboratorio, por todas las enseñanzas y la paciencia de su parte. A los integrantes del Laboratorio de Biotecnología Microbiana por hacer que el trabajo de tesis fuera un momento ameno, gracias a MC Alma Laura Díaz Pérez por enseñarme el trabajo en el laboratorio, a mis compañeros Mauricio, Güicho, Quique, etc. ya que me brindaron su amistad durante mi estancia en el laboratorio.
- A mis compañeros y amigos de generación Lore, Marco, Ricardo, Edgar, Claudia, Erika, Mili, Edith, Aarón, Sandy, Cristina, Sofi y Raúl que hicieron que los momentos más difíciles fueran más fáciles.
- A Gaby que aunque tomamos caminos diferentes, siempre estuviste a mi lado en los buenos y malos momentos.

## **DEDICATORIA**

A mi familia, que este logro es por y para ellos.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS .....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
RESUMEN.....	8
I. INTRODUCCIÓN .....	10
1. Péptidos no ribosomales.....	10
1.1. Ciclo-dipéptidos (CDPs).....	11
1.1.1. Péptido sintetetasas no-ribosomales.....	12
1.1.1.1. Lipidación de péptidos producidos no-ribosomalmente.....	14
1.1.1.2. Incorporación de D-aminoácidos por PSNR.....	14
1.1.1.3. Ciclación catalizada por el dominio tioesterasa.....	14
1.1.1.4. Diversificación de péptidos no-ribosomales por enzimas accesorias.....	15
1.1.1.4.1. Metilación de péptidos no-ribosomales.....	16
1.1.1.4.2. Incorporación de heterociclos.....	16
1.1.1.4.3. Oxidación del esqueleto peptídico.....	17
1.1.1.4.4. Halogenaciones alifáticas y aromáticas de péptidos no-ribosomales.....	18
1.1.2. Ciclo-dipéptido sintetasas.....	18
1.1.2.1. Enzimas accesorias que usan CDP obtenidos por acción de CDPS para la formación de DKPs.....	21
1.1.2.1.1. Ciclo-dipéptido oxidasa (CDO) de <i>Streptomyces noursei</i> .....	22
1.1.2.1.2. Oxidación por CypX perteneciente al citocromo P450 de <i>Bacillus subtilis</i> .....	22
1.1.2.1.3. Acoplamiento de los anillos arilo por CYP121 del citocromo P450 de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22
1.1.3. Comparación de las vías de síntesis de CDPs.....	23
2. Generalidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	23
2.1. Importancia clínica de <i>P. aeruginosa</i> .....	24
2.2. Pigmentos producidos por <i>P. aeruginosa</i> .....	24
2.3. Factores de virulencia.....	25
2.3.1. Principales sistemas reguladores de virulencia en <i>P. aeruginosa</i> .....	26
2.3.1.1. Quórum sensing.....	26
2.3.1.1.1. Quórum sensing en bacterias Gram negativas.....	27

2.3.1.1.1.1. Autoinductores. ....	28
2.3.1.1.2. Quórum sensing en <i>P. aeruginosa</i> . ....	30
2.3.1.1.2.1. Regulación del quórum sensing sobre otras redes reguladoras. ....	31
2.3.1.2. Sistema de dos componentes (SDC). ....	34
2.3.1.3. Formación de biofilm. ....	34
2.3.1.4. Producción de alginato. ....	35
2.3.1.5. Regulación de la captación de hierro. ....	35
2.3.1.5.1. Pioverdina. ....	36
2.3.1.5.2. Pioquelina. ....	36
2.3.1.5.3. Otras estrategias de captación de hierro. ....	36
2.3.1.5.3.1. Captación de xenosideróforos. ....	37
2.3.1.5.3.2. Sistemas de captación de hemo. ....	37
2.3.1.5.3.3. Captación de Fe <sup>+2</sup> a través del sistema Feo. ....	37
2.3.1.5.3.3.1. Piocianina. ....	38
2.3.1.6. Toxinas y exoproteínas. ....	38
2.3.1.7. RNA reguladores en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> . ....	39
II. ANTECEDENTES. ....	40
III. JUSTIFICACIÓN. ....	41
IV. HIPÓTESIS. ....	42
V. OBJETIVOS. ....	43
VI. MATERIALES Y MÉTODOS. ....	44
VII. RESULTADOS. ....	48
VIII. DISCUSIÓN. ....	61
IX. CONCLUSIÓN. ....	67
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de péptidos no-ribosomales con aplicaciones clínicas.....	11
Figura 2. Algunos ejemplos de DKPs .....	12
Figura 3. Principios químicos de la síntesis no-ribosomal.....	13
Figura 4. Mecanismo propuesto de la epimerización de aminoácidos.....	14
Figura 5. Mecanismo de ciclación catalizada por el dominio TE para la formación de daptomicina.....	15
Figura 6. Metilación de péptidos no-ribosomales. Mecanismo propuesto de metilación de <i>L</i> -glutamato.....	16
Figura 7. Estructura química de la vancomicina.....	17
Figura 8. Alineamiento de las secuencias de proteínas similares a AlbC.....	19
Figura 9. Mecanismo catalítico propuesto para la formación de ciclo( <i>L</i> -Leu- <i>L</i> -Leu) por YvmC-Blic.....	20
Figura 10. Vías dependientes de CDPS para la producción de CDPs y su posterior modificación por enzimas accesorias para la formación de DKPs.....	21
Figura 11. Colonias de aislamientos hospitalarios de <i>P. aeruginosa</i> .....	25
Figura 12. Representación esquemática de la regulación de genes por quórum sensing.....	27
Figura 13. Interconexión del quórum sensing con otras redes regulatorias.....	32
Figura 14. Estructura química de la pioverdina y pioquelina de <i>P. aeruginosa</i> .....	35

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunas CDPS identificadas <i>in silico</i> ..	19
Tabla 2. Moléculas autoinductoras identificadas en bacterias Gram negativas	29
Tabla 3. Funciones controladas por el circuito de quórum sensing en <i>P. aeruginosa</i> ...	30
Tabla 4. Cepas y mutantes empleadas en este trabajo.	44
Tabla 5. Resultado del BLASTp de AusA de <i>S. ureus</i> contra el genoma de <i>P.aeruginosa</i> PAO1.	48
Tabla 6. Genes de péptido sintetetasas no ribosomales de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 seleccionados para este trabajo y mutantes en estos genes.	50
Tabla 7. Resultado del BLASTp de AlbC de <i>S. noursei</i> contra el genoma de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	50

## RESUMEN

Los péptidos no ribosomales han sido descritos principalmente por sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antivirales, los cuales provienen del metabolismo secundario microbiano y su estructura básica es de aminoácidos. Estos compuestos son sintetizados por organismos unicelulares, mediante un mecanismo que no requieren de los ribosomas para catalizar la formación del enlace peptídico. Lo anterior genera una gran diversidad de estructuras debido al tipo de aminoácidos, longitud de la cadena y la adición de sustituyentes como ácidos grasos, azúcares, halógenos, D-aminoácidos, anillos tiazol y oxazol, entre otros. En este trabajo son de interés los ciclo-dipéptidos (CDPs) y sus productos finales las dicetopiperazinas (DKPs). Los cuales se caracterizan por tener un anillo central diceto, que posterior a su síntesis sufren modificaciones que les conferirán estructuras funcionalmente diversas. La mayoría de los ciclo-dipéptidos son sintetizados por péptido-sintetasas no-ribosomales modulares, que emplean ATP como cofactor. Otra vía de síntesis descrita involucra las aminoacil-ARNt sintetasas, que requieren el ARNt de transferencia para la activación de los aminoácidos. *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa capaz de producir los CDPs: ciclo(*L*-Pro-*L*-Tyr), ciclo(*L*-Pro-*L*-Phe) y ciclo(*L*-Pro-*L*-Val), cuyas propiedades encontradas se relacionan con la promoción del crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. En este sentido es de nuestro interés identificar en *P. aeruginosa* el gen o conjunto de genes responsables de codificar para las enzimas involucradas en la síntesis de los CDPs. Mediante un análisis *in silico* se hizo una pre-selección de genes candidatos y se emplearon cepas mutantes en los genes seleccionados para analizar la producción de CDPs por CG-EM, encontrando que algunas mutaciones incrementan la producción de ciclo(*L*-Pro-*L*-Phe). Al someter a las mutantes a un modelo de co-inoculación con *A. thaliana*, las mutantes *ambB*<sup>-</sup>/8984 y *pvdJ*/3265 indujeron un alargamiento de la raíz primaria, contrario al inducido por PAO1 que inhibe el crecimiento de la raíz. Se determinó que todas las mutantes producen *N*-acil-*L*-homoserina lactonas (HSL) e igual actividad elastasa, pero las mutantes *ambB*<sup>-</sup>/8984 y *pvdJ*/3265 presentaron un incremento en la concentración de piocianina. Los resultados indican que las mutaciones en los genes de probables péptido sintetasas modulares afectan de manera positiva la síntesis de CDPs y que los genes *ambB* y *pvdJ* participan en la estimulación del crecimiento vegetal que es regulada independientemente del quórum sensing.

Palabras clave: ciclo-dipéptido, no-ribosomal, *Pseudomonas*.

## ABSTRACT

Non-ribosomal peptides have been described mainly for its antimicrobial, antifungal and antiviral properties, which come from microbial secondary metabolism and basic amino acid structure. These compounds are synthesized by unicellular organisms, through a mechanism that does not require ribosomes to catalyze peptide bond formation. This generates a large variety of structures because of the type of amino acid chain length and the addition of substituents such as fatty acids, sugars, halogens, D-amino acids, thiazole and oxazole rings, among others. In this paper are of interest cyclo-dipeptides (CDPs) and their end products the Diketopiperazines (DKPs). Which are characterized by contain a central diketo ring, which undergo post-synthesis modifications will confer functionally diverse structures. Most cycle-dipeptides are synthesized by modular nonribosomal peptide synthetases that employ ATP as cofactor. Another synthesis route described involves the aminoacyl-tRNA synthases, which require transfer tRNA for activation of amino acids. *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative bacterium capable of producing the CDPs: cyclo (*L*-Pro-*L*-Tyr), cyclo (*L*-Pro-*L*-Phe) and cyclo (*L*-Pro-*L*-Val), whose properties are found relate to the promotion of growth and development of *Arabidopsis thaliana*. In this sense we are interested in identifying the *P. aeruginosa* gene or set of genes responsible for coding for enzymes involved in the synthesis of the CDPs. Using an in silico analysis was made a pre-selection of candidate genes and mutant strains were used in selected genes to analyze the production of CDPs by GC-MS, finding that some mutations increase the production of cyclo (*L*-Pro-*L* Phe). Mutants by subjecting a model co-inoculation with *A. thaliana*, the *ambB*/8984 and *pvdJ*/3265 mutants induced elongation of the primary root, contrary to PAO1 induced inhibiting root growth. It was determined that all mutants produce *N*-acyl-*L*-homoserine lactone (HSL) and equal elastase activity, but *ambB*/8984 and *pvdJ*/3265 mutants showed increased pyocyanin concentration. The results indicate that mutations in probable modular peptide synthetases genes likely positively affect the synthesis of CDP and that *pvdJ* and *ambB* genes are involved in the stimulation of plant growth which is regulated independently of quorum sensing.

Key words: cyclo-dipeptide, non-ribosomal, *Pseudomonas*.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Péptidos no ribosomales.

Los productos naturales que son producidos por microorganismos por décadas han atraído la atención en la terapéutica moderna. La bioactividad de estas sustancias estructuralmente complejas se extiende desde antibióticos a inmunosupresores y de antitumorales a citostáticos. Estos metabolitos secundarios poseen modificaciones que les brindan su función particular, además pueden ser usados como andamiaje para el desarrollo de nuevas drogas con actividades mejoradas o alteradas (Grunewald y Marahiel, 2006).

Los productos peptídicos representan una gran subclase de productos naturales, más de 1100 listados en la base de datos NORINE (Caboche, et al., 2008), muchos de los cuales desempeñan útiles actividades terapéuticas. Estos pueden ser clasificados en diferentes grupos de acuerdo a la vía de síntesis. Por ejemplo, aquellos sintetizados ribosomalmente, que pueden o no ser modificados post-traduccionalmente a sus formas activas. Otra clase de péptidos ampliamente estudiados, son aquellos producidos no-ribosomalmente. Estos péptidos no-ribosomales están constituidos no solamente por los 20 aminoácidos canónicos, contienen estructuras únicas como D-aminoácidos, ácidos grasos, metilaciones, heterociclos, glicosilaciones, fosforilaciones, etc. (Grunewald y Marahiel, 2006; Strieker, et al., 2010). Estas unidades estructuralmente diversas les confieren una gran versatilidad funcional, que conlleva a un gran espectro de aplicaciones clínicas, por ejemplo: la bacitracina producida por *Bacillus licheniformis* es usada como antibiótico en infecciones cutáneas (figura 1), la vibriobactina de *Vibrio cholerae* que es un factor de virulencia de este organismo y funciona como sideróforo de hierro, la ciclosporina A y la tirocidina A tienen propiedades inmunosupresoras y antibacteriales, respectivamente, la daptomicina es usada en el tratamiento de infecciones por Gram-positivos, esta acción la ejerce al interrumpir la membrana celular de este tipo de microorganismos, la fengicina también produce un efecto similar, pero inhibe selectivamente a hongos filamentosos. La balhimicina es un glicopéptido que es usado como antibiótico y la siringomicina E es un lipopéptido fungicida, la luzopeptina y equinomicina son usados como anticancerígenos por la propiedad de intercalarse en el ADN e impedir su replicación; sólo por mencionar algunos ejemplos (Hur, et al., 2012).

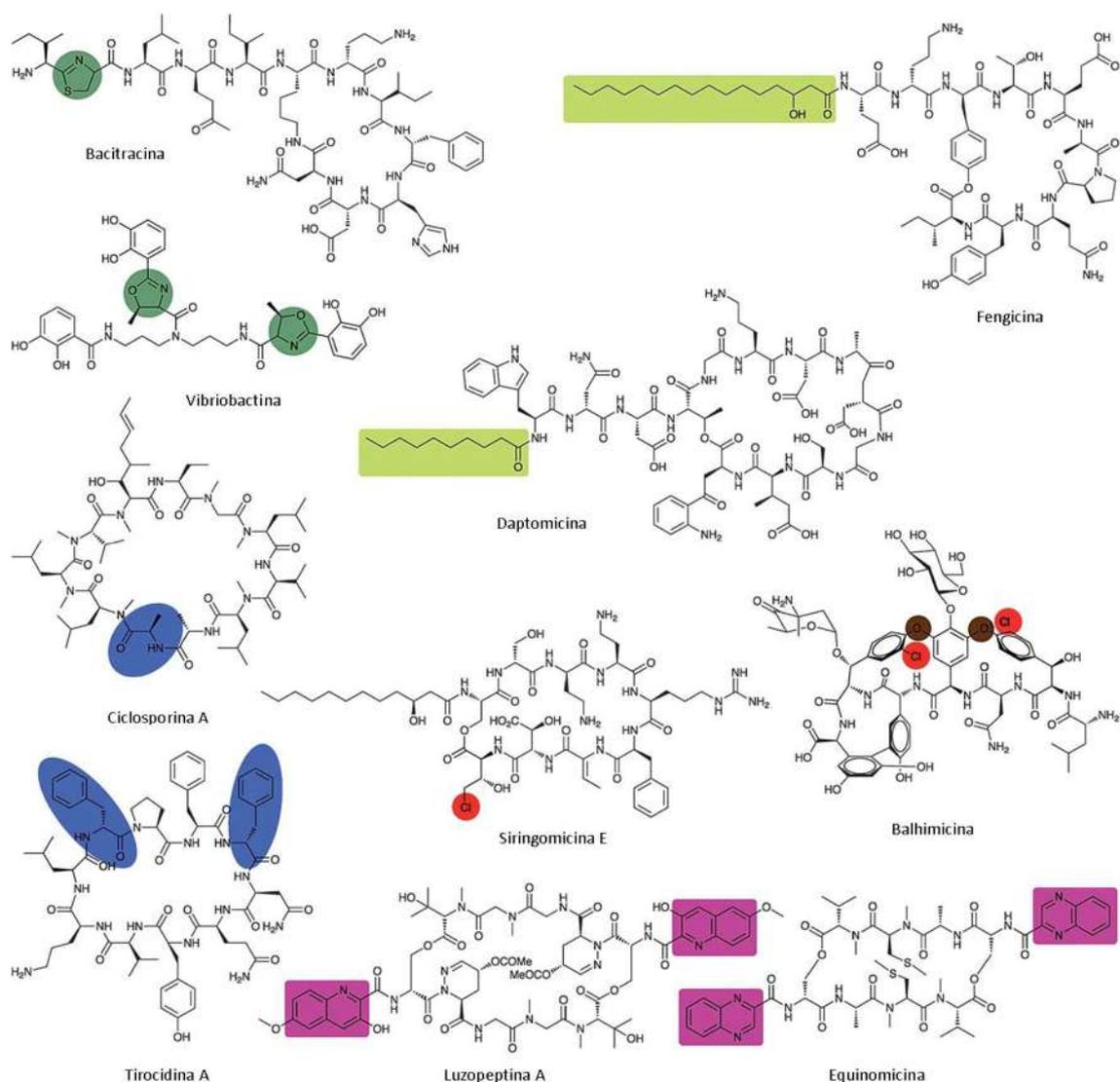


Figura 1. Ejemplos de péptidos no-ribosomales con aplicaciones clínicas. Los grupos funcionales que les proporciona la bioactividad esta resaltada en diferentes colores (modificada de Hur, et al., 2012).

### 1.1. Ciclo-dipéptidos (CDPs).

Los ciclo-dipéptidos (2,5-dioxopiperazinas, 2,5-dicetopiperazinas o dipéptidos anhídridos) y sus derivados las dicetopiperazinas (DKPs) (figura 2) constituyen una gran clase de metabolitos secundarios metabolizados por microorganismos (Prasad, 1995; Belin, et al. 2012). Recientemente han cobrado cierto interés debido a la diversidad de actividades biológicas que muestran las DKPs, como son antibacterial, antifúngica, antiviral, antitumoral, inmunosupresoras y anti-inflamatorias.

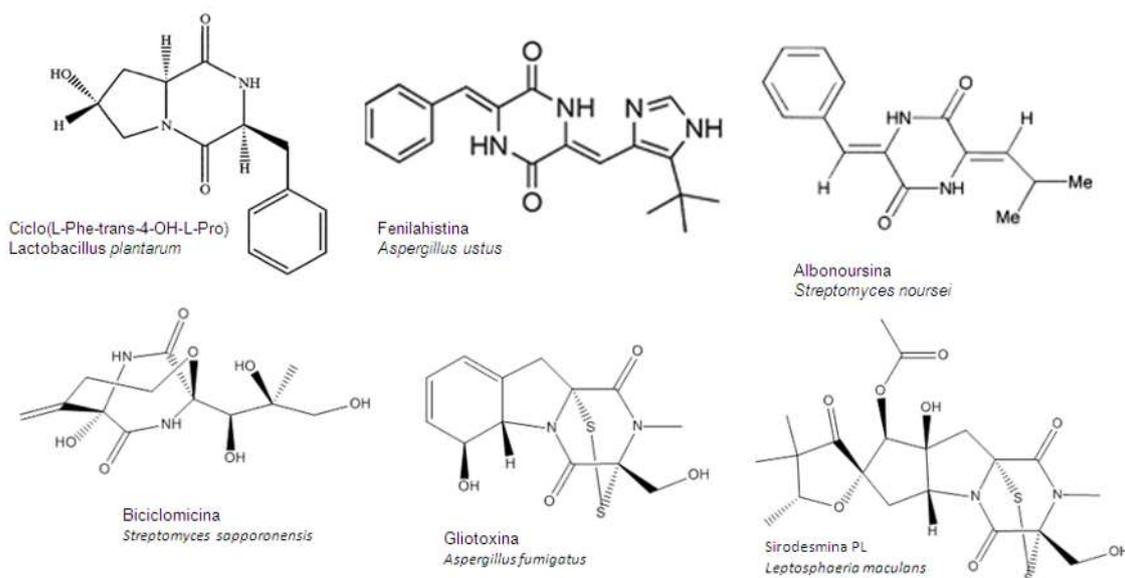


Figura 2. Algunos ejemplos de DKPs, las cuales son los productos finales de los CDPs, que se caracterizan por contener un anillo central diceto en su estructura de origen peptídico.

Desde los años de 1800 y a principios de 1900 fueron sintetizados muchos DKPs únicamente con el propósito de examinar sus interesantes propiedades físico-químicas (Prasad, 1995). En años posteriores, se encontró la existencia de una variedad de dipéptidos y DKPs en medios de cultivo y fermentaciones de levaduras, líquenes, hongos y bacterias (Prasad, 1995).

El papel biológico de las DKPs en los organismos que las producen permanece aún poco claro. Se cree que algunas DKPs pueden actuar como pequeñas moléculas difusibles involucradas en la comunicación célula-célula. Estos podrían constituir una nueva clase de señales de quórum sensing en bacterias o entre especies. Debido a los efectos en plantas y animales, incluso podría constituir un nuevo mecanismo de comunicación entre reinos (Belin, et al., 2012).

### 1.1.1. Péptido sintetadas no-ribosomales.

Las péptido sintetadas no-ribosomales (PSNR) son responsables de la síntesis de muchos productos naturales usados en la industria farmacéutica, incluyendo antibióticos (por ej. vancomicina, penicilina), compuestos anticancerígenos (por ej. bleomicina, epotilona) e inmunosupresores (ciclosporina) (Wyatt, et al., 2012). Las PSNR son enzimas de alto peso molecular, multimodulares involucradas en la síntesis de muchos péptidos no ribosomales. Cada módulo es responsable de la incorporación de un

aminoácido y está constituido por tres dominios: adenilación (A), tiolación (T) y condensación (C).

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 substratos, seguido de la activación como un aminoacil-adenilado (figura 3).

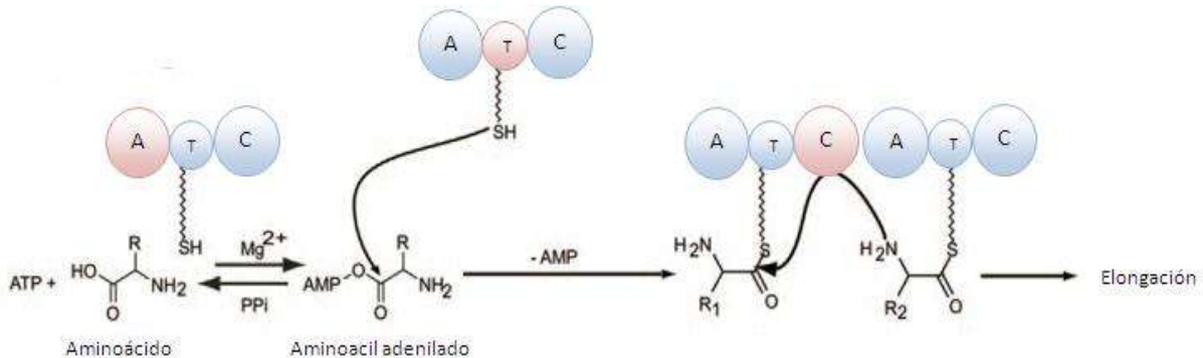


Figura 3. Principios químicos de la síntesis no-ribosomal. Los dominios en acción están indicados en rojo. Primero, el dominio A reconoce específicamente un aminoácido y cataliza la formación de un aminoacil-adenilado con el consumo de ATP. Segundo, el aminoacil-adenilado es enlazado al grupo tiol libre del cofactor ppan del dominio T. Tercero, el dominio C cataliza la elongación del péptido, para esto la amina nucleofílica del sustrato aceptador ataca nucleofílicamente el grupo tioéster electrofílico del sustrato donador (modificado de Grunewald y Marahiel, 2006).

Segundo, el aminoacil-adenilado activado es transferido al grupo tiol del cofactor 4-fosfopantéina (ppan) del dominio T, el cual es el único dominio de las PSNR sin una actividad catalítica. El dominio T (~80 aminoácidos) facilita el transporte ordenado de substratos y productos intermedios de elongación a los centros catalíticos (figura 3) (Grunewald 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 (figura 3). La direccionalidad de esta reacción está dada por un sitio donador y un sitio aceptador para electrófilos y nucleófilos, respectivamente (Grunewald y Marahiel, 2006). De acuerdo a este mecanismo el sitio aceptador une al nucleófilo con gran afinidad hasta que la entrada del electrófilo completa el proceso de condensación.

### 1.1.1.1. Lipidación de péptidos producidos no-ribosomalmente.

La lipidación de péptidos no-ribosomales ocurre mediante un mecanismo similar al descrito anteriormente para la incorporación y síntesis del enlace peptídico entre aminoácidos adyacentes. Los ácidos grasos son activados como acil-adenilatos, los cuales son entonces transferidos al cofactor ppan del dominio T del módulo correspondiente. La lipidación es una característica clave de muchos péptidos no-ribosomales como los lipopéptidos antibióticos, fengicina (figura 1), surfactina A, siringomicina y micosubtulina, por mencionar algunos (Grunewald y Marahiel, 2006).

### 1.1.1.2. Incorporación de D-aminoácidos por PSNR.

La incorporación de D-aminoácidos en una cadena peptídica es mediada por una interacción entre el dominio de epimerización (E) (~450 aminoácidos) y el dominio C río abajo (figura 4). El dominio E cataliza la racemización (equilibrio entre enantiómeros *L* y *D*) del *L*-aminoácido unido al dominio T o epimerización del C-terminal del aminoácido (equilibrio entre epímeros *L* y *D*) de la cadena peptídica creciente. En este mecanismo el dominio C río abajo del dominio E realiza una función selectiva hacia el D-aminoácido (Grunewald y Marahiel, 2006).

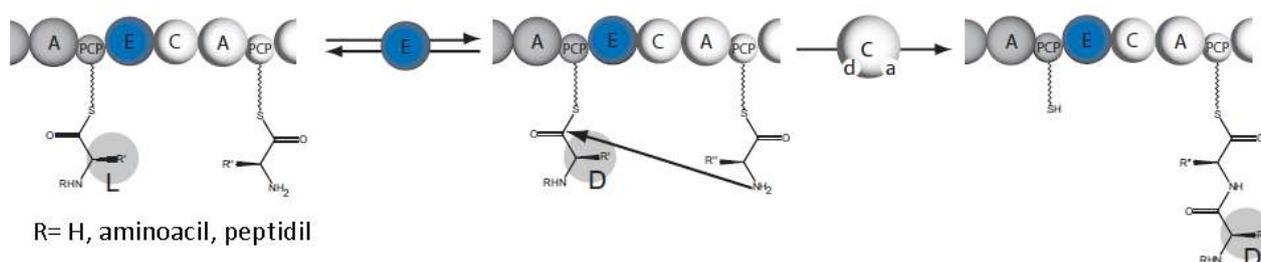


Figura 4. Mecanismo propuesto de la epimerización de aminoácidos. El dominio E convierte al sustrato aminoacil enlazado al dominio T en un equilibrio D/L. El sitio donador estereo-selectivo (d) del dominio C del módulo río abajo usa solo D-aminoácidos para la subsecuente elongación del péptido (modificado de Grunewald y Marahiel, 2006).

### 1.1.1.3. Ciclación catalizada por el dominio tioesterasa.

Los péptidos no-ribosomales crecen por la adición consecutiva de aminoácidos. Una vez que la cadena ha alcanzado la longitud completa, necesita ser liberado de la

enzima. La terminación de la síntesis peptídica es realizada por un dominio tioesterasa (Te) (~280 aminoácidos) fusionado al dominio C del módulo terminal. Esta enzima usa una serina en el sitio activo como catalizador nucleofílico. La liberación del péptido es iniciada por la transferencia de la cadena peptídica unida al cofactor ppan en la serina del sitio activo del dominio Te, que está río abajo, para generar un intermediario acil-O-Te. Este intermediario que está unido covalentemente a la enzima puede romperse por el ataque de un nucleófilo interno, produciendo así un ciclo-péptido (figura 5) (Grunewald y Marahiel, 2006).

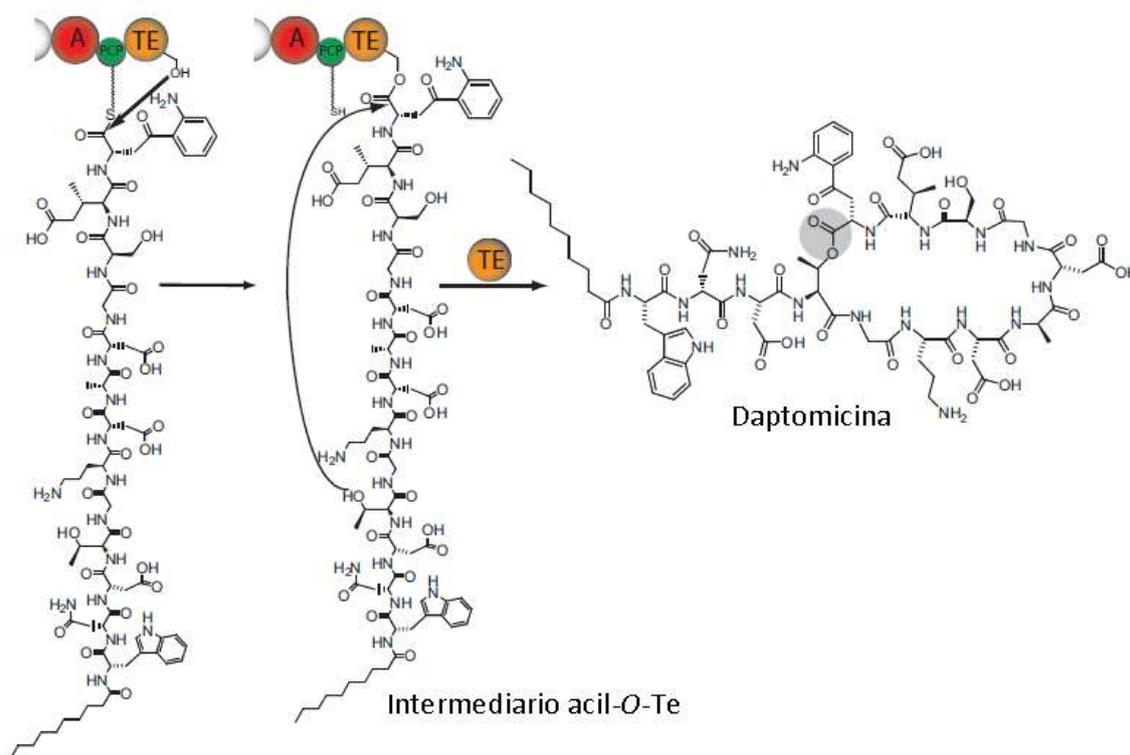


Figura 5. Mecanismo de ciclación catalizada por el dominio TE para la formación de daptomicina. El dominio TE actúa en conjunto con el dominio T río arriba que dona la cadena peptídica unida al cofactor ppan. La cadena peptídica enlazada al cofactor ppan es transferida a un residuo de serina en el dominio TE, formando un intermediario acil-O-TE. Finalmente, la ruptura del intermediario acil-O-TE ocurre por un ataque de un nucleófilo interno, produciendo un ciclo péptido (modificada de Grunewald y Marahiel, 2006).

#### 1.1.1.4. Diversificación de péptidos no-ribosomales por enzimas accesorias.

Existen enzimas suplementarias que actúan sobre la maduración de PSNR, estas enzimas realizan modificaciones como metilación, oxidación, halogenación y entrecruzamiento; aumentando así la diversidad estructural de estos productos naturales.

Además estas modificaciones proveen mayor rigidez y estabilidad (Grunewald y Marahiel, 2006).

#### 1.1.1.4.1. Metilación de péptidos no-ribosomales.

Algunos péptidos no-ribosomales, como ciclosporina, pristinamicina y actinomicina, contienen enlaces peptídicos *N*-metilados. En la mayoría de los casos, la *N*-metilación es introducida por una *N*-acil-transferasa que actúa en *cis* (~420 aminoácidos) la cual está insertada en el C terminal del dominio A acompañante (figura 6). La transferencia del grupo *S*-metil de SAM (*S*-adenosil metionina) al grupo amino ocurre cuando el respectivo aminoácido está enlazado al cofactor ppan, donde puede ocurrir la formación del enlace amida, generando el enlace peptídico *N*-metilado (Grunewald y Marahiel, 2006).

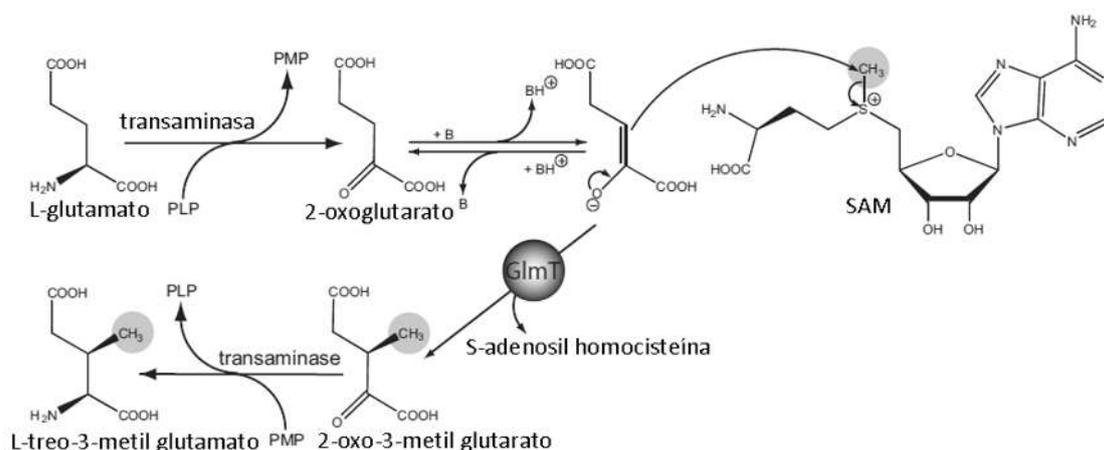


Figura 6. Metilación de péptidos no-ribosomales. Mecanismo propuesto de metilación de *L*-glutamato. El *L*-Glu es convertido en 2-oxoglutarato en presencia de una transaminasa, la cual usa piridoxal-fosfato como cofactor. Después de la desprotonación por una base, que es desconocida, GlmT cataliza la metilación estereoselectiva del enolato resultante por el uso de SAM. El producto metilado 2-oxo-metilglutarato es finalmente convertido a *L*-treo-3-metilglutamato a través del consumo de piridoxamina fosfato (PMP) (modificado de Grunewald y Marahiel, 2006).

#### 1.1.1.4.2. Incorporación de heterociclos.

En algunos casos el dominio C es sustituido por un dominio de ciclización (Cy). El dominio Cy cataliza la ciclo deshidratación del enlace peptídico para generar heterociclos rígidos de cinco miembros, como las oxazolininas derivadas de treonina o serina, y tiazoles derivados de cisteína. En muchos casos, la heterociclización catalizada por el dominio Cy es seguida de una oxidación de dos electrones para formar oxazoles y tiazoles aromáticos. Esto se logra por un dominio de oxidación (Ox) (~250

aminoácidos), el cual usa mononucleótidos de flavina como cofactor. Por ejemplo, la bacitracina contiene el anillo tiazolina que le confiere complejidad (figura 1, resaltado en color verde), esta complejidad previene la desfosforilación de los fosfolípidos, un paso clave en la biosíntesis de la pared celular, lo cual lleva a la inhibición de péptidoglicano matando bacterias no deseables; y vibriobactina que contiene dos anillos oxazolininas, que ayudan a posicionar los grupos hidroxilo de los catecoles para quelar iones metálicos, como Fe (III) (Grunewald y Marahiel, 2006).

### 1.1.1.4.3. Oxidación del esqueleto peptídico.

Las reacciones de oxidación del esqueleto peptídico son realizadas por enzimas oxidasas que actúan independientemente de la línea de ensamblaje de las PSNR y confiere una gran rigidez estructural. Aunque se conoce poco acerca del mecanismo, estas oxidaciones son específicas y parece que se llevan a cabo mientras se realiza el proceso de elongación de la cadena peptídica. Por ejemplo, para la síntesis de vancomicina (figura 7) y balhimicina se llevan a cabo tres reacciones de entrecruzamiento de las cadenas laterales ricas en electrones y estas reacciones son catalizadas por las enzimas oxidasas tipo citocromo P450: OxyA, OxyB y OxyC (Grunewald y Marahiel, 2006).

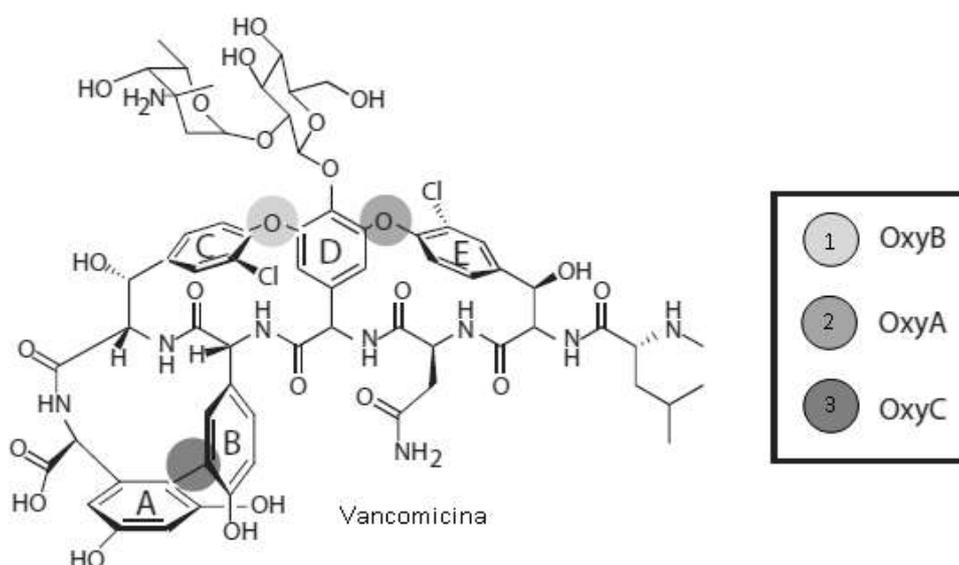


Figura 7. Estructura química de la vancomicina. El orden de las reacciones de oxidación está dado por OxyB (1), OxyA (2) y finalmente OxyC (3). Estas oxidaciones sobre la estructura del péptido confieren rigidez estructural (modificada de Grunewald y Marahiel, 2006).

#### **1.1.1.4.4. Halogenaciones alifáticas y aromáticas de péptidos no-ribosomales.**

Las halogenaciones alifáticas y aromáticas son realizadas por halogenasas, que incorporan bromuro, cloruro y yoduro a los esqueletos de carbono de los péptidos no-ribosomales (figura 1, siríngomicina E y balhímicina). Las halogenaciones tienen consecuencias significativas sobre la bioactividad de estos productos naturales. Por ejemplo, el análogo desclorado del antibiótico balhímicina es de 8 a 16 veces menos activo contra distintas bacterias patógenas (Grunewald y Marahiel, 2006).

#### **1.1.2. Ciclo-dipéptido sintasas.**

En 2002 se encontró para la formación de albonoursina producida por *Streptomyces noursei* se requiere de AlbC, una enzima pequeña (239 residuos) que fue caracterizada como una ciclo-dipéptido sintasa (CDPS) y cuya actividad cataliza la formación del ciclo dipéptido 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 PSNR anteriormente descritas, cuya acción cataliza la formación de péptidos no-ribosomales (Watanabe, et al., 2007; Gondry, et al., 2009).

Las CDPS utilizan aminoacil-ARNt como sustratos para la formación de ciclo-dipéptidos y no son dependientes de ATP para la formación del enlace peptídico (Bonfond, et al., 2011). Mediante análisis *in silico* se encontraron otros posibles genes candidatos a codificar para CDPS, aunque mostraron una baja identidad (19-27%) y similitud (37-45%) con respecto a AlbC de *S. noursei* (tabla 1). Un alineamiento de las secuencias no reveló secuencias consenso y solo siete residuos conservados (Gly35, Ser37, Gly79, Tyr128, Tyr178, Glu182 y Tyr202, de acuerdo a la secuencia de *S. noursei*) (Gondry, Sauguet et al. 2009). Posteriormente, estas secuencias fueron expresadas en *E. coli* y caracterizada su función como CDPS (Gondry, et al., 2009).

Tabla 1. Algunas CDPS identificadas *in silico*. Las cuales pertenecen a diferentes phyla bacterianos: Firmicutes (*Bacillus*, *Staphylococcus*), Actinobacteria (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*) y  $\gamma$ -Proteobacteria (*Photorhabdus*) (tomada de Gondry, et al., 2009).

Nombre de la proteína	Organismo	Numero de residuos	Identidad/Similitud con AlbC
AlbC	<i>Streptomyces noursei</i> ATCC 11455	239	100/100
Rv2275	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	289	26/41
Yvmc	<i>Bacillus subtilis subtilis</i> str 168	248	27/44
Yvmc	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	249	27/43
Yvmc	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelensis ATCC 35646	238	24/43
Plu0297	<i>Photorhabdus luminescens laumondii</i> TTO1	234	27/45
pSHaeC06	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCSC1435	234	19/40
Jk0923	<i>Corynebacterium jeikeium</i> K411	216	20/37

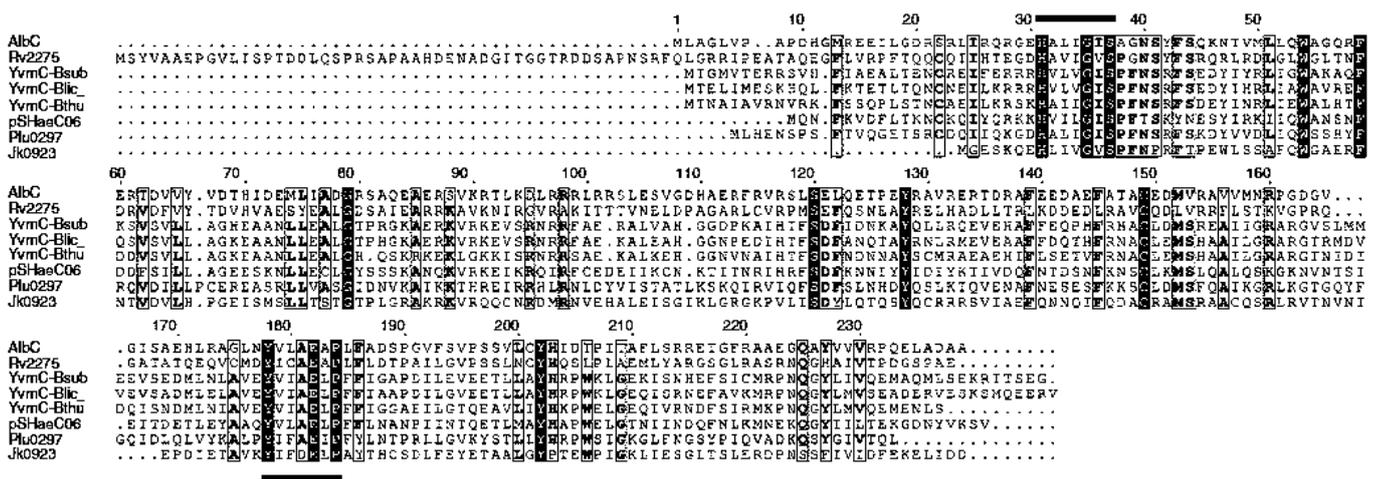


Figura 8. Alineamiento de las secuencias de proteínas similares a AlbC. Las posiciones con residuos idénticos están indicadas por un fondo negro y las posiciones con residuos idénticos en al menos seis proteínas están delineadas. Las líneas arriba o abajo del alineamiento indican la posición de las dos regiones con residuos conservados, Hx[LVII][LVI]G[LVI]S y Y[LVI]xxExP (tomado de Gondry, et al., 2009).

Las CDPS usan dos aminoacil-ARNt como sustratos en un mecanismo secuencial tipo “ping-pong” para formar los dos enlaces peptídicos del ciclo-dipéptido. El primer paso catalítico involucra el enlace del primer aminoácido a la serina del sitio activo para formar un intermediario acil-enzima. El acil-enzima entonces reacciona con el aminoácido del segundo aminoacil-ARNt para formar un intermediario dipeptidil que mediante ciclación intramolecular, lleva a la formación final del ciclo-dipéptido (Moutiez, et al., 2014).

Mediante análisis mutacionales y bioinformáticos se ha propuesto un mecanismo catalítico para la enzima YvmC-Blic, que es el más aceptado hasta el momento (figura 9). Desde la unión del Leu-ARNt, el grupo amino de la leucina es posicionada apropiadamente por puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de los residuos Glu184 y Ser37 de la proteína (paso 1). El éster carbonilo es repolarizado por el grupo amida del residuo Asn40, el cual facilita el ataque nucleofílico por el grupo hidroxilo de la Ser37. La trans-esterificación inicial no requiere Glu184 (paso 2). Después, el segundo Leu-ARNt se une y su grupo amino interactúa con el grupo carboxilo de la Glu184 (paso 3). El grupo amino de la primer leucina ataca el éster carbonilo del segundo Leu-ARNt, para generar una di-leucina unida a la enzima (paso 4). Finalmente, la di-leucina adopta una conformación *cis*, lo cual permite una ciclación rápida y espontanea por el ataque del grupo amida de la segunda leucina al éster carbonilo de la primer leucina (paso 5).

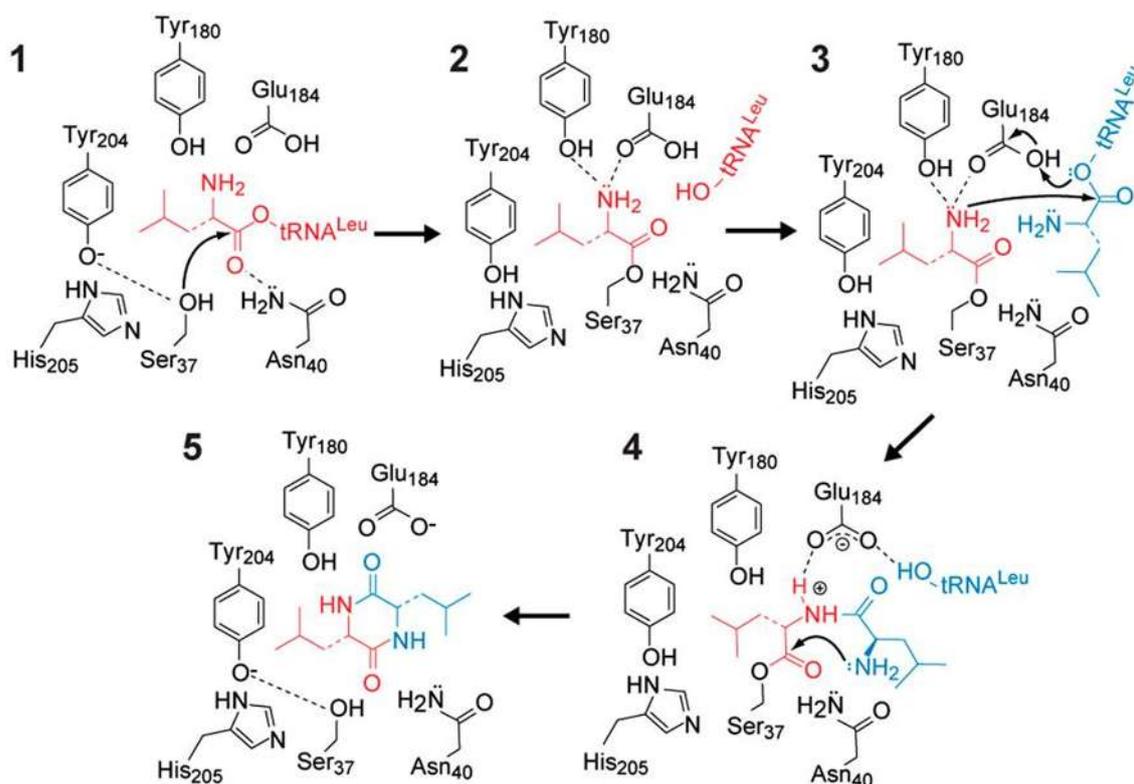


Figura 9. Mecanismo catalítico propuesto para la formación de ciclo(L-Leu-L-Leu) por YvmC-Blic. 1) Incorporación y estabilización del primer Leu-ARNt (color rojo), 2) Formación de un intermediario acil-enzima, 3) Interacción del segundo Leu-ARNt con el acil-enzima, 4) Ataque del grupo amino de la primer Leu al éster carbonilo del segundo Leu-ARNt para formar una acil-di-leucina, y 5) Reacción de ciclación para formar ciclo(L-Leu-L-Leu) (tomada de Bonnefond, et al., 2011).

Existen disponibles tres estructuras cristalinas de CDPS. Las tres comparten una arquitectura similar al dominio catalítico de las aminoacil-ARNt sintetetasas de clase I. De manera convencional las aminoacil-ARNt sintetetasas catalizan la formación de aminoacil-ARNt en una reacción de dos pasos que consiste de la activación del aminoácido por la formación de un intermediario aminoacil-adenilado, seguido de la esterificación al hidroxilo-3' del correspondiente ARNt. Las CDPS pudieron adquirir nuevos residuos en el sitio activo, convirtiéndolas en enzimas formadoras de ciclo dipéptidos, por lo cual los ARNt son sustratos en lugar de productos (Moutiez, et al., 2014).

### 1.1.2.1. Enzimas accesorias que usan CDP obtenidos por acción de CDPS para la formación de DKPs.

Solo se han caracterizado tres proteínas relacionadas a la modificación de CDPs y muestran tres actividades diferentes:  $\alpha,\beta$ -deshidrogenación (albonoursina), oxidación (ácido pulcherriminico) y acoplamiento de anillos arilo (micociclosina) (figura 9) (Belin, et al., 2012).

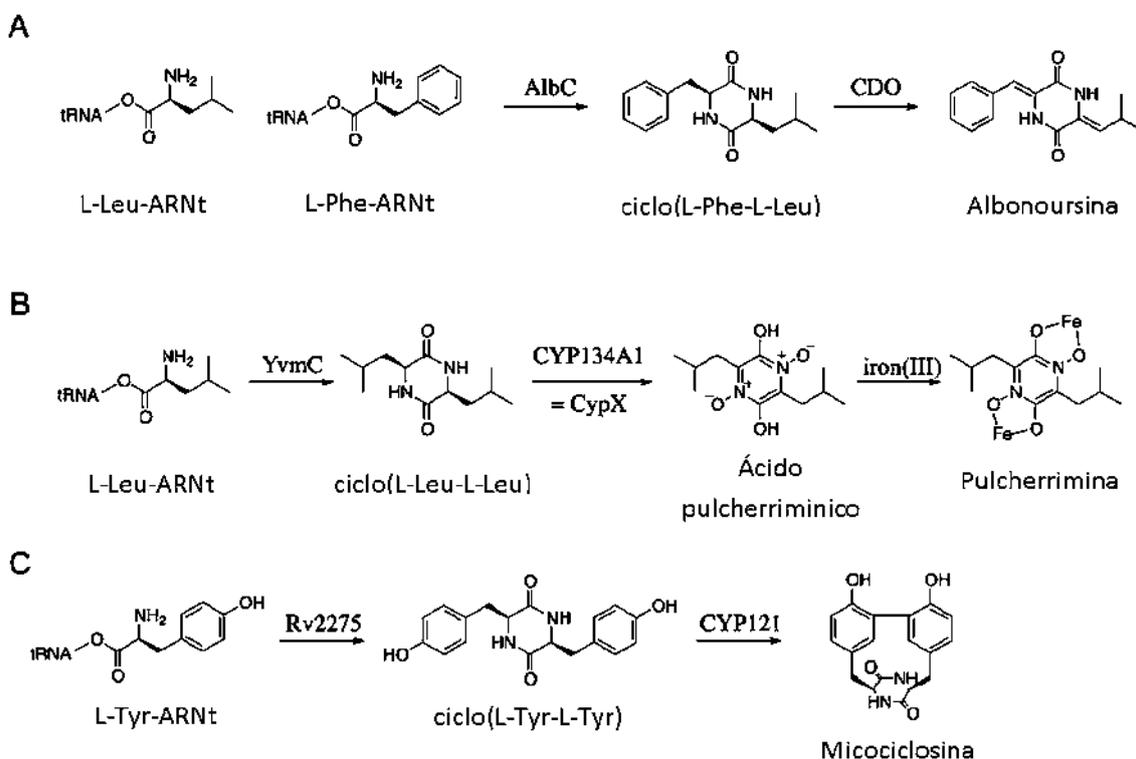


Figura 10. Vías dependientes de CDPS para la producción de CDPs y su posterior modificación por enzimas accesorias para la formación de DKPs. Vías catalíticas para la formación de albonoursina (A), pulcherrimina (B) y micociclosina (C) (tomada de Belin, et al., 2012).

#### **1.1.2.1.1. Ciclo-dipéptido oxidasa (CDO) de *Streptomyces noursei*.**

La ciclo-dipéptido oxidasa de *Streptomyces noursei* es una enzima multimérica, que consiste de subunidades de AlbA (23 kDa), y AlbB (11 kDa) parece ser esencial para la función de AlbA, ya que AlbA por si sola no puede realizar su función de  $\alpha,\beta$ -deshidrogenación de ciclo-dipéptidos, esta utiliza flavina como cofactor, con O<sub>2</sub> como aceptor de electrones y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como producto lateral. El ciclo-dipéptido es secuencialmente transformado en bis-deshidro dicetopiperazina (albonoursina) (Belin, et al., 2012).

#### **1.1.2.1.2. Oxidación por CypX perteneciente al citocromo P450 de *Bacillus subtilis*.**

Las enzimas del citocromo P450 constituyen una superfamilia de monooxigenasas que contienen el grupo hemo y que disocian el oxígeno molecular para catalizar un gran número de reacciones sobre un amplio rango de moléculas estructuralmente diversas. En *Bacillus subtilis* el papel de CypX en la oxidación de ciclo(L-Leu-L-Leu) fue demostrado experimentalmente, con lo que se genera ácido pulcherriminico que al asociarse con Fe(III) formará pulcherrimina. Cuando se purificó CypX generó un espectro UV-Vis (ultravioleta-visible) similar al espectro característico de las enzimas del citocromo P450, además de contar en su estructura con la presencia de un grupo hemo funcional, lo anterior indica la relación de CypX con el citocromo P450. El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la oxidación del substrato aún no ha sido esclarecido (Belin, et al., 2012).

#### **1.1.2.1.3. Acoplamiento de los anillos arilo por CYP121 del citocromo P450 de *Mycobacterium tuberculosis*.**

CYP121 de *Mycobacterium tuberculosis* es la enzima accesoria de CDPS más estudiada a la fecha, debido principalmente a las implicaciones clínicas del organismo de estudio. CYP121 se expresa en forma de operón con Rv2275 y es necesaria la integridad genética para el crecimiento micobacteriano, por lo que se cree desempeñan una función esencial en el proceso infeccioso. Rv2275 cataliza la reacción de formación de ciclo(L-Tyr-L-Tyr) que posteriormente será modificada por la acción de CYP121 que llevará a la formación micociclosina (Belin, et al., 2012).

### 1.1.3. Comparación de las vías de síntesis de CDPs.

Los sistemas enzimáticos de PSNR y CDPS producen DKPs en la naturaleza. Las CDPS son proteínas pequeñas (alrededor de 26 kDa), mientras que las PSNR son sistemas multienzimáticos 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 PSNR 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 PSNR 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 (Belin, et al., 2012).

En cuanto a su distribución en la naturaleza, es interesante que las PSNR 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 (Belin, et al., 2012).

Algo más a resaltar es que los DKPs obtenidos a partir de CDPS solamente se tienen hipótesis acerca de su función, mientras que para las PSNR generalmente se le ha asignado una función (sideróforos, toxinas, etc.) (Belin, et al., 2012).

## 2. Generalidades de *Pseudomonas aeruginosa*.

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa con forma de bastón, aeróbica, que mide de 0.5-0.8  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.5-3.0  $\mu\text{m}$  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, así su hábitat está ampliamente distribuido considerándose ubicuo por su capacidad de colonizar suelos, aguas y otros ambientes artificiales (Jayaseelan, et al., 2013). El género *Pseudomonas* fue incluido en la familia *Pseudomonadaceae*. Otros miembros en el 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.

### **2.1. Importancia clínica de *P. aeruginosa*.**

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 de tracto urinario de pacientes cateterizados, y neumonía en pacientes intrahospitalarios. También es una causa predominante de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis cística. Estas infecciones son difíciles de erradicar debido a la resistencia natural de la bacteria a los antibióticos comúnmente usados (Stover, et al., 2000; Karatuna y Yagci, 2010).

### **2.2. Pigmentos producidos por *P. aeruginosa*.**

Los pigmentos secretados por *P. aeruginosa* incluyen la piocianina (verde azulado), pioverdina (amarillo, verde y fluorescente), piomelanina (café brillante) y piorubrina (café rojizo) (Merino, 2007). Cuando la pioverdina se combina con el pigmento fenazínico verde azulado piocianina, se crea el color verde brillante característico de *P. aeruginosa* (figura 11).

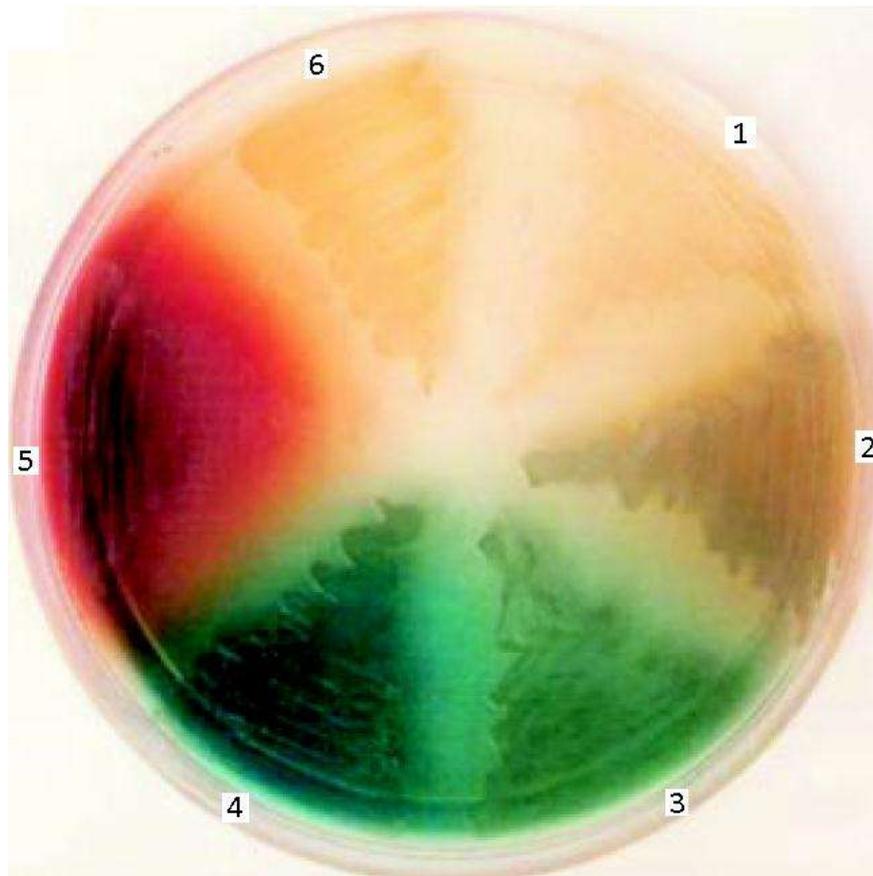


Figura 11. Colonias de aislamientos hospitalarios de *P. aeruginosa*. Se aprecian los diferentes pigmentos producidos sobre agar Mueller Hinton, luego de 48 h de incubación a 28 °C. Piocianina (verde azulado) (1), pioverdina (amarillo, verde y fluorescente) (6), piomelanina (café brillante) (5) y piorrubina (café rojizo) (2) (tomada de Merino, 2007).

### 2.3. Factores de virulencia.

Cientos de genes han sido implicados en la virulencia de *P. aeruginosa* basados en los datos una gran variedad de modelos de infección a diferentes huéspedes. Muchos de los factores relacionados a virulencia mejor estudiados de *P. aeruginosa* con las proteínas y/o células del huésped, incluyen los sistemas de secreción (tipo I, II, III y IV) y efectores asociados (incluidos ExoT, ExoU, ExoS, ToxA, fosfolipasa C y proteasa alcalina), flagelo y estructuras involucradas en la unión a las células del huésped como pili tipo IV. Otros factores de virulencia reconocidos incluyen aquellos involucrados en el quórum sensing (HSL y PQS), adquisición de hierro (pioquelina y pioverdina), síntesis de pequeñas moléculas/toxinas (fenazinas, ácido cianhídrico), alginato, lipopolisacáridos (LPS) y biofilm (Feinbaum, et al., 2012).

### **2.3.1. Principales sistemas reguladores de virulencia en *P. aeruginosa*.**

El gran genoma de *P. aeruginosa* contiene una gran cantidad de redes reguladoras, con ~8 % del total del genoma dedicado a las proteínas reguladoras. En *P. aeruginosa* PAO1 codifica 434 reguladores transcripcionales, 24 factores  $\sigma$  y 34 RNA pequeños, muchos de los cuales no han sido caracterizados. Sin embargo, las redes reguladoras predichas indican que hay un gran entrecruzamiento entre los diferentes reguladores transcripcionales. La red reguladora de factores de virulencia es extremadamente intrincada, con muchos huecos en la información obtenida y la predicha, debido principalmente a que la función de muchos de los genes se mantiene desconocida (Balasubramanian, et al., 2013). La regulación transcripcional y post-transcripcional de las vías críticas que determinan la patogénesis de *P. aeruginosa* se describen a continuación.

#### **2.3.1.1. 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 población, como fue observado con el fenómeno de bioluminiscencia en la bacteria Gram negativa *Vibrio fischeri* y la regulación de la competencia genética en la bacteria Gram positiva *Streptococcus pneumoniae* (Juhas, et al., 2005; Ng y Bassler, 2009). Ambos fenómenos que parecen tan diversos son controlados por lo que se conoce como “quórum sensing” (*quorum*, del latín “de los cuales”, se refiere a la proporción o número de individuos necesarios para llegar a un consenso; *sensing*, del inglés “percepción”). El quórum sensing es el proceso de comunicación célula a célula en el cual las bacterias usan la producción y posterior detección de señales químicas extracelulares llamadas autoinductores, que encienden redes de señalización que desencadenaran la expresión de genes de una población (figura 12).

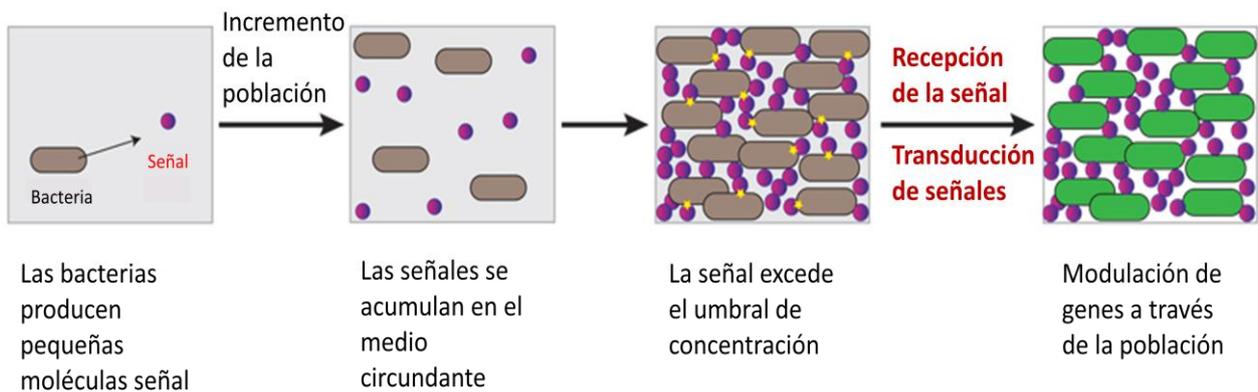


Figura 12. Representación esquemática de la regulación de genes por quórum sensing. Cuando una bacteria produce una señal química o autoinductor, esta difunde al medio circundante, a medida que incrementa la población se van acumulando las señales hasta que se excede un umbral de concentración. Lo que lleva a la activación de rutas de señalización que a su vez activaran la expresión génica (modificada de Dessaux, et al., 2011).

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

### 2.3.1.1.1. Quórum sensing en bacterias Gram negativas.

El quórum sensing fue descubierto en la bacteria luminosa 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 produce luminiscencia, lo cual se cree que ayuda a los animales a escapar de depredadores. Interesantemente, la bioluminiscencia solo se presenta cuando existe la interacción simbiótica y no en el estado de vida libre. Esta regulación de la bioluminiscencia está mediada por el sistema LuxI-LuxR que pertenece a la red de señalización de quórum sensing. LuxI sintetiza la señal que es una acil-homoserina lactona (AHL) de seis carbonos, 3-oxo-hexanoil-HSL, y a medida que las AHL se acumulan llevan a la unión y activación de su regulador específico LuxR. El LuxR activado se une a secuencias palindrómicas específicas del ADN, llamadas “caja lux”, donde recluta a la ARN polimerasa, así aumentando la expresión de genes (Gonzalez y Keshavan, 2006).

La gran mayoría de sistemas de quórum sensing en bacterias Gram negativas que han sido estudiadas utilizan AHL como moléculas señalizadoras (de Kievit e Iglewski, 2000). Además de las AHL, 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 autoinductores 2, ciclo dipéptidos, y otros (Gonzalez y Keshavan, 2006; Atkinson y Williams, 2009).

#### **2.3.1.1.1.1. Autoinductores.**

Los autoinductores son usualmente moléculas pequeñas que pueden difundir libremente a través de las membranas celulares o ser transportadas pasivamente fuera de la célula (tabla 2). A continuación se mencionan algunas de las más estudiadas.

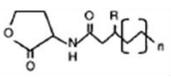
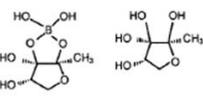
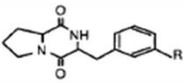
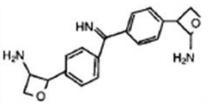
***N*-acil-*L*-homoserina lactonas.** Son el principal tipo de señales autoinductoras en bacterias Gram negativas. Tienen un anillo homoserina lactona conservado con una cadena lateral acilada variable. Basado en la longitud de la cadena lateral, las AHL se pueden clasificar en moléculas de cadena larga (10 a 18 carbonos) y cadena corta (4 a 8 carbonos). La longitud y nivel de saturación de las cadenas laterales acoplado a la presencia o ausencia de la sustitución de un oxo o hidroxilo en el carbono 3 de la cadena lateral provee variación y especificidad para la comunicación por quórum sensing en una mezcla de poblaciones bacterianas, aunque la comunicación cruzada se llega a presentar (Gonzalez y Keshavan, 2006).

**Autoinductor 2 (AI-2).** La señalización tipo AI-2 está involucrada en la bioluminiscencia de *V. harveyi*, secreción tipo III en *E. coli* O157:H7, el factor de virulencia VirB en *Shigella flexneri*, solo por mencionar algunos ejemplos. AI-2 se ha descrito como una molécula global para la comunicación interespecies, y es producida tanto por bacterias Gram negativas como por Gram positivas. La estructura de AI-2 fue identificada como una furanosil borato diéster que está conformada por dos anillos fusionados de cinco miembros conteniendo un átomo de Boro enlazando el diéster (Gonzalez y Keshavan, 2006).

**Ciclo-dipéptidos.** Se ha hipotetizado su posible función como autoinductores debido a la capacidad de activar los biosensores de AHL. Algunos de estos ciclo dipéptidos, como ciclo(*L*-Ala-*L*-Val), ciclo(*L*-Pro-*L*-Tyr) y ciclo(*L*-Phe-*L*-Pro), actúan como antagonistas que compiten con 3-oxo-hexanoil-AHL por el regulador LuxR e inhiben los genes regulados por quórum sensing. Aunque para los ciclo dipéptidos el

umbral de inducción de la proteína LuxR es mucho mayor, alrededor de 0.3 mM, mientras que para el 3-oxo-hexanoil-AHL es de 1 nM (Gonzalez y Keshavan, 2006).

Tabla 2. Moléculas autoinductoras identificadas en bacterias Gram negativas (tomada de Gonzalez y Keshavan, 2006).

Autoinductores	Estructura general	R	Especies productoras	Fenotipo(s) regulados
AHL		O ó OH (n= 0-7)	Muchas bacterias gram-negativas	Motilidad, exopolisacáridos, otros
AI-2			<i>V. harvei</i> , <i>S. entérica</i> serovar Tiphymurium	Bioluminiscencia, transportadores ABC
Cyclo(L-Phe-L-Pro), cyclo(L-Tyr-L-Pro)		H ó OH	<i>P. fluorescens</i> , <i>P. alkaligenes</i>	Cepas indicadoras de activación cruzada de quorum-sensing
Bradioxetina			<i>B. japonicum</i>	Nodulación
DFS			<i>X. campestris</i>	Producción endoglucanasa

**Bradioxetina.** Diversas investigaciones muestran que las moléculas señal tipo bradioxetina están presentes en extractos de varias cepas de *Rhizobium*, así como otras especies del grupo de las  $\alpha$ -proteobacterias. La bradioxetina es un factor de densidad celular que está involucrado en la regulación dependiente de densidad poblacional de los genes *nod*, que regulan el proceso de nodulación en *Bradyrhizobium japonicum*, una bacteria Gram negativa, simbionte fijadora de nitrógeno de plantas leguminosas (Gonzalez y Keshavan, 2006).

**Factor de señal difusible (DSF).** En *Xanthomonas campestris*, causa de la enfermedad de la raíz negra, la regulación de la producción de enzimas extracelulares como proteasas, pectinasas y celulasas, utiliza un mecanismo de comunicación que no emplea AHL. La expresión de estas exoenzimas junto con el control de la dispersión de biofilm, resistencia a toxinas y supervivencia es conducida por un pequeño factor de

señal difusible (DSF) caracterizado químicamente como ácido *cis*-11-metil-2-dodecenoico (Atkinson y Williams, 2009; Gonzalez y Keshavan, 2006).

### 2.3.1.1.2. Quórum sensing en *P. aeruginosa*.

Uno de los sistemas de comunicación célula a célula más estudiados es el de *P. aeruginosa*. En este organismo se descubrió que el circuito de quórum sensing es esencial para la expresión de factores de virulencia, así como para la formación de biofilm y se ha especulado que la actividad patógena y la regulación por quórum sensing están estrechamente ligadas para el establecimiento efectivo de la infección (de Kievit e Iglewski, 2000; Juhas, et al., 2005). Muchos de los factores de virulencia secretados y fenotipos, como la formación de biofilm, están bajo el control del quórum sensing (tabla 3).

Tabla 3. Funciones controladas por el circuito de quórum sensing en *P. aeruginosa* (tomada de Juhas, et al., 2005).

Controlado por <i>las</i>	Controlado por <i>rhl</i>	Controlado por <i>PQS</i>
síntesis de PQS	síntesis de PQS	sistema <i>rhl</i>
sistema <i>rhl</i>	ramnolípidos	ramnolípidos
formación de biofilm		formación de biofilm
proteasa alcalina	proteasa alcalina	
elastasa	elastasa	elastasa
	piocianina	piocianina
lipasa	lipasa	
	lecitinas A y B	lecitinas A y B
ác. cianhídrico	ác. cianhídrico	
secreción Xcp	secreción Xcp	
	quitinasa	
	RpoS	
exotoxina A		
neuraminidasa		
endoproteasa PvdS		
catalasa		
superóxido dismutasa		
aminopeptidasa		
swimming		
	exoenzima S	
swarming	swarming	
twiching	twiching	

Dos sistemas de quórum sensing íntimamente ligados operan en *P. aeruginosa* y son el sistema *las*, que consiste del activador transcripcional LasR y de la sintasa de AHL LasI, esta última cataliza la síntesis de *N*-3-oxododecanoil-homoserina lactona; y el sistema *rhl*, que consiste del regulador transcripcional RhlR y de la sintasa de AHL, esta última cataliza la síntesis de *N*-butanoil-homoserina lactona (Huang, et al., 2003;

Juhas, et al., 2005; Schuster y Greenberg, 2006). Los sistemas *las* y *rhl* son homólogos al sistema LuxR-LuxI de *V. fischeri*, por lo que el modelo de señalización por quórum sensing funciona de una manera similar, inicia con el autoinductor (*N*-3-oxododecanoil-homoserina lactona ó *N*-butanoil-homoserina lactona) que es producido a niveles basales a bajas densidades celulares. Entonces la concentración del autoinductor incrementa conforme aumenta la densidad celular 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 (tabla 3), entre los que incluyen las sintasas de AHL (LasI y RhII), lo que crea un circuito de retroalimentación o autoinducción. Estos sistemas están arreglados de manera jerárquica donde el sistema *las* activa al sistema *rhl* (Pesci, et al., 1997).

Existe un tercer sistema de regulación de quórum sensing en *P. aeruginosa*, es llevado a cabo por señales de quinolonas, químicamente caracterizado como 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS), y este provee un enlace entre los sistemas *las* y *rhl*. La síntesis de PQS es controlada por ambos sistemas dependientes de AHL *las* y *rhl*. La transcripción de genes requerida para la síntesis PQS es regulada 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 *N*-3-oxododecanoil-homoserina lactona y *N*-butanoil-homoserina lactona, sugiriendo un delicado balance entre los dos sistemas (Juhas, et al., 2005).

#### **2.3.1.1.2.1. Regulación del quórum sensing sobre otras redes reguladoras.**

El quórum sensing de *P. aeruginosa* es un sistema de regulación global, bastante complejo, que afecta muchas funciones celulares diferentes. Por lo que parece evidente que el sistema de regulación por quórum sensing dentro de una red de regulación global (Schuster y Greenberg, 2006). Esto se sustenta en experimentos donde se adiciona señales de HSL exógenas, donde los genes controlados por quórum sensing mostraron una respuesta retrasada (Schuster, et al., 2003). Estas observaciones sugieren que la activación de la mayoría de los genes controlados por quórum sensing no es únicamente detonado por la acumulación de la señal 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* (figura 13) (Schuster y Greenberg, 2006).

Aunque no se conoce completamente el mecanismo preciso de todas las interacciones entre los sistemas regulatorios y el quórum sensing. Existen por lo menos dos niveles de jerarquía que pueden funcionar para la interconexión de las señales descritas abajo. LasR representa el punto central con el mayor punto de interconexión de las vías, esto se fundamenta por el hecho de que regula cientos de genes, incluidos algunos de los reguladores 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 Greenberg, 2006).

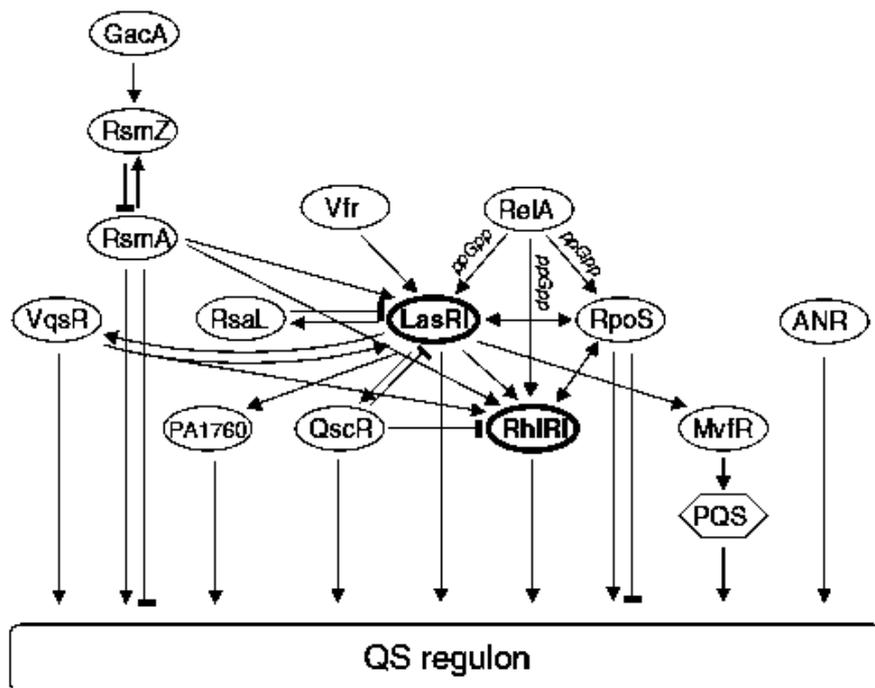


Figura 13. Interconexión del quórum sensing con otras redes regulatorias (tomada de Schuster y Greenberg, 2006).

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

**RelA.** La sobreexpresión de la proteína de respuesta astringente RelA, la cual sintetiza tetrafosfato guanosina (ppGpp) bajo condiciones de deficiencia de amino

ácidos, lleva a la inducción temprana de muchos procesos controlados por quórum sensing, producción de HSL, así como la expresión de *lasR* y *rhlR*.

**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 algunos (ácido cianhídrico y piocianina) e induciendo 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 RhlR y requiere un elemento de secuencia conservado, llamado caja FNR/ANR, en la región regulatoria río arriba de *hcnABC*. ANR parece ser un importante factor 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 sintasa cognada. Parece que QscR retrasa la activación de genes controlados por quórum sensing a través de la formación de heterodímeros con LasR y RhlR. 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.** MvfR activa los genes requeridos para producir el precursor directo de PQS, y esta 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*.

#### **2.3.1.2. Sistema de dos componentes (SDC).**

Uno de los mecanismo por los cuales *P. aeruginosa* percibe las señales externas es usando proteínas sensoras, que a través de fosforilaciones y desfosforilaciones, activan reguladores transcripcionales específicos. Estas proteínas reguladoras-sensoras son llamadas sistemas de dos componentes (SDC). Los SDC implican mecanismos sofisticados de señalización marcados por un diseño altamente modulado que ha sido adaptado e integrado a una amplia variedad de circuitos de señalización celular. Esta compuesto de una histidin-cinasa sensora integrada a la membrana (HK) y un regulador de respuesta citoplásmico (RR). El HK contiene un dominio N terminal que detecta estímulos específicos (dominio sensor) y un dominio transmisor citoplásmico C terminal que comprende un dominio de dimerización, una histidina conservada y un dominio catalítico adenosin-trifosfato. *P. aeruginosa* PAO1 posee ~127 miembros del SDC, comparado con 60 de *E. coli* y 70 en *Bacillus subtilis*, reflejando la capacidad de adaptación de *P. aeruginosa* (Balasubramanian, et al., 2013).

#### **2.3.1.3. Formación de biofilm.**

Los biofilms son comunidades bacterianas multicelulares encapsuladas asociadas a una superficie en una matriz extracelular compuesta de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos que regulan interacciones célula a célula y célula a superficie. Los biofilms pueden formarse en superficies bióticas o abióticas. La formación y mantenimiento del biofilm está estrechamente regulada en respuesta a amenazas ambientales, confiriendo resistencia aumentada ante agentes antimicrobianos y mecanismos de defensa inmune. La formación de biofilm es un proceso multi etapas que es iniciado por la unión a la superficie de las bacterias para formar una monocapa, una agregación clonal para la formación de microcolonias, maduración para formar estructuras con forma de hongo y dispersión. La unión a la superficie de *P. aeruginosa* ha sido atribuida a pili tipo IV, flagelos, ADN libre, alginato y los polisacáridos Pel y Psl. Los componentes de la matriz extracelular polimérica son los polisacáridos Pel y Psl, alginato y ADN libre. Aunque el alginato es el principal componente del biofilm y por lo tanto afecta su estructura, no es esencial para la formación del biofilm. El quórum

sensing regula la lisis celular en el biofilm, por lo tanto regula la liberación de ADN extracelular. El quórum sensing también regula la producción de ramnolípidos que promueven la motilidad y de esta manera afecta la estructura de hongo en los biofilms maduros, y también el mantenimiento de los canales del biofilm (Balasubramanian, et al., 2013). En estudios clínicos con pacientes con fibrosis cística, se ha observado que el quórum sensing es determinante para la formación de biofilms, ya que mutantes en los sistemas *las* y *rhl* tuvieron una menor predominancia en establecer infecciones crónicas, con mayor importancia el sistema *rhl* (Karatuna y Yagci, 2010).

#### 2.3.1.4. Producción de alginato.

El exopolisacárido alginato es un polímero lineal de ácido  $\beta$ -D-manurónico y ácido  $\alpha$ -L-gulurónico, el cual estimula la producción de los anticuerpos IgG e IgA. A pesar de que la producción de alginato es metabólicamente agotador, protege a la bacteria de la fagocitosis y anticuerpos, así confiriendo una ventaja en la supervivencia (Balasubramanian, et al., 2013).

#### 2.3.1.5. Regulación de la captación de hierro.

Al igual que la mayoría de los organismos, en *P. aeruginosa* el hierro es crítico para el crecimiento. Biológicamente el hierro utilizable ( $\text{Fe}^{+2}$ ) es escaso y está disponible principalmente en su forma insoluble  $\text{Fe}^{+3}$ . Para ayudar a superar la deficiencia de hierro libre, y en el caso de las bacterias patógenas necesitan competir con las proteínas secuestradoras de hierro (transferrina y lactoferrina), las bacterias producen sideróforos que unen el hierro y lo transportan al interior de la célula a través de receptores en la superficie de la célula (Ankenbauer, et al., 1986; Balasubramanian, et al., 2013). *P. aeruginosa* produce dos sideróforos, pioverdina y pioquelina (figura 14), caracterizados como de alta y baja afinidad, respectivamente (Cornelis y Dingemans, 2013).

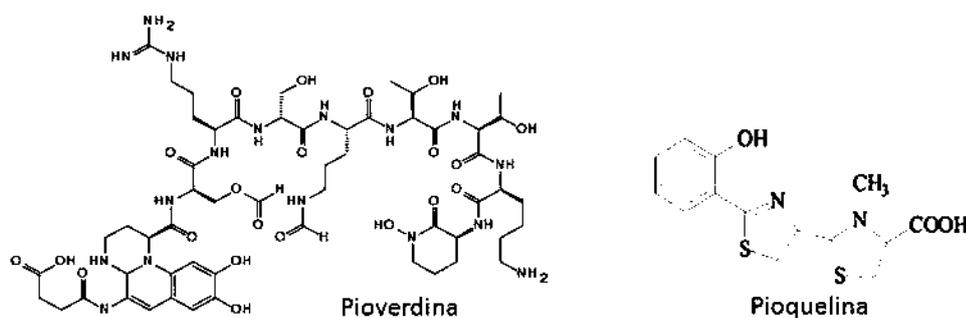


Figura 14.  
Estructura química de la pioverdina y pioquelina de *P. aeruginosa*.

#### **2.3.1.5.1. Pioverdina.**

Previamente llamada fluoresceína bacteriana, la pioverdina es un complejo péptido que contiene dos grupos hidroxamato y un derivado dihidroxiquinolona (Ankenbauer, et al., 1986). Las pioverdinas son una característica de las especies fluorescentes del género *Pseudomonas*. La pioverdina de *P. aeruginosa* es un sideróforo compuesto de una cadena peptídica y un cromóforo. La parte del cromóforo de la molécula está conservado y participa en la unión del  $\text{Fe}^{+3}$  mientras que la cadena peptídica es muy variable (entre 6 y 12 aminoácidos) entre las especies de *Pseudomonas* o incluso entre cepas de la misma especie, en *P. aeruginosa* se han reconocido tres tipos diferentes. Las pioverdinas unen hierro con una gran afinidad, son capaces de desplazar el hierro de la transferrina (Cornelis y Dingemans, 2013). Una vez que el hierro ha sido solubilizado es transportado a la membrana exterior de la célula donde es percibido por receptores específicos y después entra en acción el sistema TonB para la translocación a través de la membrana citoplásmica. Cuando el hierro está dentro de la célula, es liberado de los ferrisideróforos por un proceso reductivo antes de alcanzar sus blancos (Meyer, et al., 1996).

#### **2.3.1.5.2. Pioquelina.**

La pioquelina es un sideróforo fenólico que contiene dos anillos heterocíclicos que contienen azufre (Ankenbauer, et al., 1986). El mecanismo de captación es similar que para la pioverdina. En *P. aeruginosa* la pioquelina es reconocida por FtpA, un transportador específico de membrana externa para ser translocado al interior de la célula para liberar el hierro y ser utilizado (Noel, et al., 2014). Se ha demostrado que *P. aeruginosa* primero produce pioquelina y cambia a producción de pioverdina solo cuando la concentración de hierro es realmente bajo (Cornelis y Dingemans, 2013).

#### **2.3.1.5.3. Otras estrategias de captación de hierro.**

Además de la producción de sideróforos, *P. aeruginosa* utiliza otras estrategias para la captación de hierro: 1) A través de la captación de xenosideróforos (diferentes a los producidos por la bacteria), 2) A través de la captación de la molécula hemo de las hemoproteínas del huésped, 3) A través de la reducción extracelular del  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  involucrando compuestos fenazínicos y un sistema de captación de  $\text{Fe}^{+2}$  denominado sistema Feo.

### **2.3.1.5.3.1. Captación de xenosideróforos.**

*P. aeruginosa* posee alrededor de 30 genes que codifican para receptores dependientes del sistema TonB, la mayoría de ellos involucrados en la captación de ferrosideróforos. Por ejemplo, las pioverdinas de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 y *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446, cepabactina de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*, desferriferrioxamina B, y enterobactina, que son transportados a través de receptores especializados constitutivos o inducibles, ó por la porina F (Cornelis y Dingemans, 2013; Meyer, et al., 1996).

### **2.3.1.5.3.2. Sistemas de captación de hemo.**

El grupo hemo no se encuentra en su forma libre debido a que es altamente hidrofóbico, por lo que se asocia con las membranas donde promueve reacciones redox no enzimáticas. Por lo que el grupo hemo debe ser extraído de hemoproteínas como hemoglobina y hemopexina. *P. aeruginosa* tiene la capacidad de tomar el grupo hemo a través de dos sistemas Has y Phu. En el sistema Phu el hemo es directamente extraído por un receptor dependiente de TonB, mientras que en el sistema Has, primero es extraído el hemo por una proteína excretada llamada hemóforo. El complejo hemóforo-hemo es reconocido por HasR, que es otro receptor dependiente de TonB. Ya que el hemo está en el citoplasma es degradado por la hemo-oxigenasa HemO para formar biliverdina, CO y  $Fe^{+3}$  (Cornelis y Dingemans, 2013).

### **2.3.1.5.3.3. Captación de $Fe^{+2}$ a través del sistema Feo.**

A diferencia del  $Fe^{+3}$ , el  $Fe^{+2}$  es soluble y está presente en condiciones anaeróbicas o en ambientes microaeróbicos a pH bajo. El  $Fe^{+2}$  probablemente difunde a través de la membrana externa y después es transportado al citoplasma por el sistema FeoABC, que está presente en muchas especies de bacterias Gram negativas. El  $Fe^{+2}$  soluble es transportado por el sistema de transporte compuesto por la permeasa FeoB y las proteínas FeoA y FeoC. Como se menciono anteriormente, el  $Fe^{+2}$  disponible es limitado y generalmente se encuentra el hierro como  $Fe^{+3}$ , para contrarrestar este problema son sintetizados moléculas como las fenazinas, que tienen un gran potencial redox, con lo que reducen el  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$ , para ser captado por el sistema Feo (Mavrodi, et al., 1998). *P. aeruginosa* produce piocianina, una fenazina producida abundantemente en medios deficientes de hierro (Jayaseelan, et al., 2013).

### **2.3.1.5.3.3.1. Piocianina.**

La fenazina es un compuesto heterocíclico proveniente del metabolismo secundario de color rojo, producido por *P. aeruginosa*, el cual es convertido en ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) de color amarillo y finalmente convertido en piocianina de color azul brillante. Se han identificado siete genes necesarios para la síntesis de piocianina *phzC,D,E,F,G,M* y *S*, donde *phzM* y *phzS* son los genes responsables de convertir PCA a piocianina (Jayaseelan, et al., 2013).

Como se mencionó anteriormente, la piocianina y su precursor el PCA tienen una actividad importante en la reducción del  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$ , debido a la actividad redox de la molécula. Pero además, es conocida la actividad antibacteriana de la piocianina, que es dependiente de la concentración y tiene una acción diferencial hacia diferentes especies bacterianas. Se ha propuesto que el mecanismo por el cual la piocianina inhibe el crecimiento bacteriano, es a través de la interacción con la cadena respiratoria de la membrana celular con lo que inhabilita a las células bacterianas de realizar adecuadamente el proceso de transporte de electrones al desestabilizarlo por la acción redox de la piocianina sobre las proteínas de la cadena transportadora de electrones (Jayaseelan, et al., 2013).

Las concentraciones de hierro en la célula influyen en la expresión de factores de virulencia. El enlace entre el hierro y el quórum sensing en *P. aeruginosa* es complejo. Los sistemas de quórum sensing están aumentados bajo condiciones limitadas de hierro, y los principales reguladores de quórum sensing también están involucrados en la regulación de genes en respuesta a hierro (Balasubramanian, et al., 2013).

### **2.3.1.6. Toxinas y exoproteínas.**

Las exoproteínas son un importante componente de sobrevivencia bacteriana no solo debido a que permite interactuar a la bacteria con su ambiente inmediato y otros organismos en la vecindad, si no que también desempeñan un papel crítico en la virulencia. En *P. aeruginosa* hay una gran cantidad de proteínas secretadas y cinco de los siete tipos de secreción (tipo I, II, III, V y VI) caracterizados en bacterias. La mayoría de las proteínas secretadas son toxinas que ayudan a la virulencia, como LasA, LasB, PrpL, ToxA, fosfolipasas, etc, que son excretadas a través de los sistemas de secreción Xcp tipo II. Las moléculas efectoras que son cruciales para evadir la respuesta fagocítica del huésped son secretadas a través del sistema de secreción tipo III, mientras

que el sistema tipo I secreta la proteasa alcalina AprA y el haemoforo HasAp (Balasubramanian, et al., 2013).

La inactivación del quórum sensing de *P. aeruginosa* ha mostrado reducir la expresión de las proteasas, quitinasas y lipasas excretadas por el sistema de excreción Xcp tipo II. El SDC PhoBR regula otras exoproteínas secretadas por el sistema de excreción II, como PlcH, PlcC, PlcN y la fosfatasa alcalina LapA del sistema de excreción Hxc tipo II. Los tres sistemas pertenecientes al sistema de excreción tipo IV (HSI-I, HSI-II y HSI-III) son regulados diferencialmente, LasR y MvfR regulan negativamente al sistema HSI-I, y positivamente la expresión de HSI-II y HSI-III. La expresión del sistema de excreción tipo III es regulado transcripcional y post-transcripcionalmente en respuesta al contacto con la célula huésped y niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  ambiental (Balasubramanian, et al., 2013).

#### **2.3.1.7. RNA reguladores en la virulencia de *P. aeruginosa*.**

Los llamados ARN pequeños (ARNs) o ARN reguladores (ARNrg), afectan todos los pasos en las vías de expresión de genes en procariontes y eucariontes, estos ARNs son ARN diferentes de los ARN mensajeros (ARNm), ARN de transferencia (ARNt) o ARN ribosomales (ARNr). La regulación por los ARNs ocurre en una de dos vías, a través del apareamiento con DNA o ARNm, ó al afectar la actividad de una proteína o complejo proteico. La mayoría de los ARNrg que han sido caracterizados en *P. aeruginosa* tienen un papel en la regulación de genes de virulencia (Balasubramanian, et al., 2013).

## II. ANTECEDENTES.

Como se mencionó anteriormente, *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista de humanos (siendo la principal causa de fibrosis cística), además se ha encontrado como patógeno de plantas (Ortiz-Castro, et al., 2014; Plotnikova, et al., 2000; Stover, et al., 2000). A pesar de esto, Ortiz Castro y col. en 2011 encontraron que *P. aeruginosa* PAO1 tiene una actividad promotora del crecimiento vegetal. Esta actividad promotora fue atribuída a los ciclo-dipéptidos: ciclo(*L-Pro-L-Tyr*), ciclo(*L-Pro-L-Phe*) y ciclo(*L-Pro-L-Val*), producidos por la bacteria y se observó una respuesta incrementada en las mutantes del quórum sensing *lasI*, *rhlI* y la doble mutante *lasI/rhlI*, sugiriéndose una posible regulación negativa de los ciclo-dipéptidos a través del quórum sensing. En este trabajo se propuso que la inducción del crecimiento vegetal es similar a la realizada por las auxinas y es llevada a cabo a nivel del receptor de auxinas *TIR1*, que reconoce y se activa a través de la interacción con los ciclo-dipéptidos. Dicha interacción mostró ser diferencial, donde ciclo(*L-Pro-L-Tyr*) tuvo la mayor actividad auxínica y ciclo(*L-Pro-L-Phe*) tuvo la menor actividad (Ortiz-Castro, et al., 2011).

### **III.JUSTIFICACIÓN.**

Los ciclo-dipéptidos (CDPs) y sus derivados, las dicetopiperazinas (DKPs), son de gran interés por sus diversas propiedades biológicas. A pesar de esto, las enzimas que producen estos compuestos son desconocidas. En particular, en *Pseudomonas aeruginosa* es desconocida la(s) enzima(s) que cataliza(n) la formación de los CDPs: ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe), por lo que generar información al respecto permitiría avanzar en el conocimiento existente de la comunicación célula-célula.

#### **IV. HIPÓTESIS.**

Las mutaciones en probables péptido sintetas no-ribosomales en *P. aeruginosa* PAO1 modifican la producción de los CDPs: ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe).

## **V. OBJETIVOS.**

### **OBJETIVO GENERAL:**

Identificar y evaluar en *P. aeruginosa* el efecto de la mutación de probable(s) péptido sintasa(s) involucradas en la síntesis de los CDPs: ciclo(*L-Pro-L-Tyr*), ciclo(*L-Pro-L-Val*) y ciclo (*L-Pro-L-Phe*).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Seleccionar el(los) gen(es) que codifica(n) para probable(s) péptido sintasa(s) de *P. aeruginosa* PAO1.
2. Determinar la producción de ciclo(*L-Pro-L-Tyr*), ciclo(*L-Pro-L-Val*) y ciclo(*L-Pro-L-Phe*) en las mutantes en los genes seleccionados.
3. Evaluar el efecto de la mutación de *P. aeruginosa* PAO1 en los genes de las probables péptido sintasas no-ribosomales seleccionadas sobre el crecimiento de plantas de *A. thaliana*.
4. Evaluar el efecto de la mutación de las probables péptido sintasas no-ribosomales sobre la producción de HSL y factores de virulencia en *P. aeruginosa* PAO1.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1. Cepas.

Las cepas bacterianas y mutantes utilizadas en este trabajo se describen brevemente en la siguiente tabla:

Tabla 4. Cepas y mutantes empleadas en este trabajo.

Cepas	Características	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Cepa estándar de laboratorio	Stover, et al., 2000
JM2	Cepa doble mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en los genes <i>lasI</i> y <i>rhlI</i>	Latifi, et al., 1996
177	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA3327	Jacobs, et al., 2003
468	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA2402	Jacobs, et al., 2003
778	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA2424	Jacobs, et al., 2003
2016	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA2400	Jacobs, et al., 2003
3265	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA2400	Jacobs, et al., 2003
4216	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA2302	Jacobs, et al., 2003
5061	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA2305	Jacobs, et al., 2003
8984	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA2305	Jacobs, et al., 2003
21095	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>lacZ</i> /hah en el ORF PA4078	Jacobs, et al., 2003
41376	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>phoA</i> /hah en el ORF PA4225	Jacobs, et al., 2003
42724	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>phoA</i> /hah en el ORF PA4078	Jacobs, et al., 2003
45465	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>phoA</i> /hah en el ORF PA3327	Jacobs, et al., 2003
49903	Cepa mutante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 por transposón IS <i>phoA</i> /hah en el ORF PA4226	Jacobs, et al., 2003
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC	Cepa estándar de laboratorio	McClellan, et al., 1997
CV026	Cepa mutante de <i>C. violaceum</i> ATCC en la sintetasa de HSL	McClellan, et al., 1997

## 2. Medios de cultivo

### Medio mínimo M9

Buffer de Fosfatos:

6 g de  $\text{KHPO}_4$

3 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0.5 g de  $\text{NaCl}$

1 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$

$\text{H}_2\text{O}$  cbp 1 L, pH 7.4

Esterilizar y adicionar:

2 mL de  $\text{MgSO}_4$  1M

10 mL de Glucosa 20%

0.1 mL de  $\text{CaCl}_2$  1 M

2.5 mL de Trazas de metales

### Luria-Bertani (LB)

10 g de Peptona de caseína

5 g de Extracto de levadura

5 g de  $\text{NaCl}$

$\text{H}_2\text{O}$  cbp 1 L, pH 7

### Murashige-Skoog (MS) 0.2X

0.866 g de Sales MS

6 g de Sacarosa

7 g fitoagar

$\text{H}_2\text{O}$  cbp 1 L, pH 7

## 3. Métodos

Extracción de DKPs de *P. aeruginosa*.

Se inocula 1-2 mL de medio LB (pre-inoculo), posteriormente incubar 12-16 h a una temperatura de 37 °C y agitación constante a ~200 rpm. Después se inoculan 50 mL de medio mínimo M9 con 1-2 mL de pre-inoculo, incubar por 24 h a una temperatura de 37 °C y agitación constante a ~200 rpm. De este crecimiento tomar 10 mL, centrifugar a

7000 rpm por 10 min. Tomar 1 mL del crecimiento de 24 h y registrar lectura de D.O. a  $\lambda=600$  nm. Se recupera el sobrenadante de los 10 mL y se agrega un volumen igual de acetato de etilo con ácido acético 0.01% v/v, dar dos agitaciones vigorosas de 2 min. Enseguida se toma la fase orgánica. A la fase acuosa se agrega un volumen igual de acetato de etilo con ácido acético 0.01 % y recuperar fase orgánica. Evaporar hasta sequedad (Rotavapor R-215; Buchi) a 60 °C, se redisuelve con acetato de etilo acidificado (1 mL aprox.). La solución recuperada se concentra hasta sequedad en vacío (CentriVAp DNA Concentrator; LABCONCO), completar volumen a 1 mL con metanol (CG-EM). Finalmente, centrifugar a 5000 rpm por 5 min y recuperar sobrenadante.

Análisis por CG-EM.

Las muestras resultantes de la extracción con acetato de etilo y disueltas en metanol, se analizaron por CG-EM (Agilent GC System 7890A equipado con Agilent MSD 5975C). El volumen de la muestra inyectada fue de 1  $\mu$ L empleando un automuestreador, usando He como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min, en una columna capilar de 30 m x 250  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m, con una matriz de 5% de fenil metil siloxano a una temperatura inicial de 70 °C por 2 min, seguido de un incremento de 20 °C/min hasta una temperatura de 230 °C y posteriormente a una temperatura final de 270 °C, con una temperatura de detector de 300 °C y una temperatura de inyección de 250 °C.

Factores de virulencia.

Piocianina:

Tomar 5 mL de crecimiento bacteriano de 24 h y centrifugar a 7000 rpm por 10 min. Se recupera el sobrenadante y agregar 3 mL de cloroformo, enseguida se agita vigorosamente por 20 min. Retirar fase acuosa y agregar 1 mL de HCl 0.2 N a la fase orgánica. Se agita vigorosamente por 20 min. Tomar fase acuosa y registrar lectura de D.O. a  $\lambda=520$  nm. Determinar concentración de piocianina con la formula:

$$[\text{piocianina}] = \text{D.O. } 520 \text{ nm} * 17.072$$

Elastasa:

Tomar 1 mL de crecimiento bacteriano de 24 h y centrifugar a 7000 rpm por 10 min, se toman 250  $\mu$ L del sobrenadante y agregar 10 mg de Elastin-Congo Red, disuelto en 1 mL de buffer A (Tris-HCl 0.1 M, CaCl<sub>2</sub> 1mM, pH 7), se incuba 12-16 h a 37 °C con agitación constante. Después de la incubación se centrifuga a 10000 rpm por 5 min y se recupera el sobrenadante. Registrar lectura de D.O. a  $\lambda=495$  nm.

Desinfección de semillas de *A. thaliana*.

En tubo Eppendorf de 1.5 mL agregar 1 mL de etanol al 96% por 7 min con agitación, después se centrifuga a 5000 rpm por 2 min y se etira el etanol. Posteriormente se adiciona 1 mL de solución comercial de cloro al 20% por 7 min con agitación, después se centrifuga a 5000 rpm por 2 min y se retira la solución de cloro. Finalmente se dan 6 lavados de H<sub>2</sub>O estéril. Almacenar a 4 °C por 2 días.

Co-inoculación de *A. thaliana* con *P. aeruginosa*.

Semillas de *A. thaliana* col-0 (previamente desinfectadas) se sembraron en cajas de Petri con medio MS 0.2X (aprox. 10 semillas/caja) y se incubaron en cámara de crecimiento (Lumistell IC-54) a 21 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. A los 4 días de germinación se inoculó una estría de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 a una distancia aprox. de 5 cm de la punta de la raíz, y se incubaron bajo las mismas condiciones de crecimiento anteriores. A los 8 días de co-inoculación se analizaron:

- Longitud de la raíz principal cada 2 días de co-inoculación
- Numero de raíces laterales
- Densidad de raíces laterales

## VII. RESULTADOS.

### Selección de genes probables de péptido sintetas no-ribosomales de *P. aeruginosa* PAO1.

Para la búsqueda en *P. aeruginosa* PAO1 de posibles genes codificantes para péptido sintetas no ribosomales, se usó como sonda la secuencia de la proteína AusA de *Staphylococcus aureus*, que codifica para una péptido sintetasa no ribosomal bimodular de 2389 aminoácidos cuya función esta reportada para catalizar la formación de ciclo(L-Phe-L-Val), ciclo(L-Tyr-L-Val) y ciclo(L-Leu-L-Val). Al hacer el análisis BLASTp (matriz BLOSUM62, tamaño de letra 3, máximo de 100 secuencias) en la página web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Altschul, et al., 1997), de la secuencia de AusA contra el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 nos arrojó una lista de 36 posibles genes candidatos (tabla 5).

Tabla 5. Resultado del BLASTp de AusA de *S. ureus* contra el genoma de *P. aeruginosa* PAO1.

ORF	Descripción	Score	E value
PA2399	Pioverdina sintetasa D	795	0.0
PA2400	PvdJ	750	0.0
PA2424	PvdL	756	0.0
PA2402	Probable péptido sintetasa no ribosomal	736	0.0
PA3327	Probable péptido sintetasa no ribosomal	560	2e-163
PA2305	AmbB	299	3e-83
PA4078	Probable péptido sintetasa no ribosomal	246	3e-67
PA1221	Proteína hipotética	212	1e-57
PA4225	Pioquelina sintetasa	175	2e-44
PA2302	AmbE	166	2e-41
PA4226	Ácido dihidroaeruginoso sintetasa	162	2e-40
PA2557	Probable enzima de unión a AMP	94	5e-20
PA4733	Acetil coenzima A sintetasa	85.9	2e-17
PA0887	Acetil coenzima A sintetasa	83.2	2e-16
PA3300	CoA ligasa de acidos grasos de cadena larga	79	2e-15
PA3299	CoA ligasa de acidos grasos de cadena larga	74.3	6e-14
PA4198	Probable enzima de unión a AMP	68.6	4e-12
PA4228	PchD proteína de biosíntesis de pioquelina	67.4	1e-11
PA3924	Probable acil CoA ligasa de cadena media	65.5	4e-11
PA3860	Probable enzima de unión a AMP	61.2	1e-9
PA1215	Proteína hipotética	55.8	3e-8
PA3568	Probable acetil CoA sintetasa	56.2	3e-8
PA2555	Probable enzima de unión a AMP	49.7	3e-6
PA0996	Probable coenzima A ligasa	45.4	5e-5
PA1997	Probable enzima de unión a AMP	42.7	4e-4
PA1617	Probable enzima de unión a AMP	42	8e-4
PA1384	UDP-glucosa 4-epimerasa	40.4	0.001
PA2893	Putativa acil CoA sintetasa de cadena muy larga	36.2	0.038
PA1559	Proteína hipotética	35.4	0.047
PA4361	Probable oxidoreductasa	33.5	0.23
PA4423	Probable proteína conservada	32.3	0.62
PA5213	Proteína P1 del sistema de escisión de glicina	32.3	0.63
PA1869	Probable proteína acarreadora de acilo	29.6	0.75
PA2335	Probable receptor dependiente de TonB	31.6	1.1
PA4138	Tirosil-ARNt sintetasa	29.6	4.3

La lista de 36 candidatos fue depurada en base al score, el valor E (esperado) y la función asignada de los genes. Posteriormente, se analizaron los posibles dominios de cada gen en la herramienta en línea HMMER en la página <http://hmmer.janelia.org/search/hmmscan> (figura 15), con lo que se descartaron las secuencias que no contaron con los dominios de adenilación, tiolación y condensación, característicos para la función de las proteínas PSNR (péptido sintetasa no-ribosomal). En base a lo anterior, la lista de genes candidatos utilizados en este trabajo fue de 9 (tabla 6). De estos 9 genes se adquirieron cepas mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 de la biblioteca de mutantes por transposición de la Universidad de Washington (Jacobs, et al, 2003). En la tabla 6 se enlistan los genes seleccionados, una breve descripción, el nivel de clasificación (de acuerdo al grado de caracterización usado en la página <http://pseudomonas.com/>), el número y tipo de dominio, el número de identificación de las mutates (ID, seleccionadas del banco de mutantes de la Unidad de Ciencias Genómicas de la Universidad de Washington) y el tipo de transposón utilizado para generar la mutación.

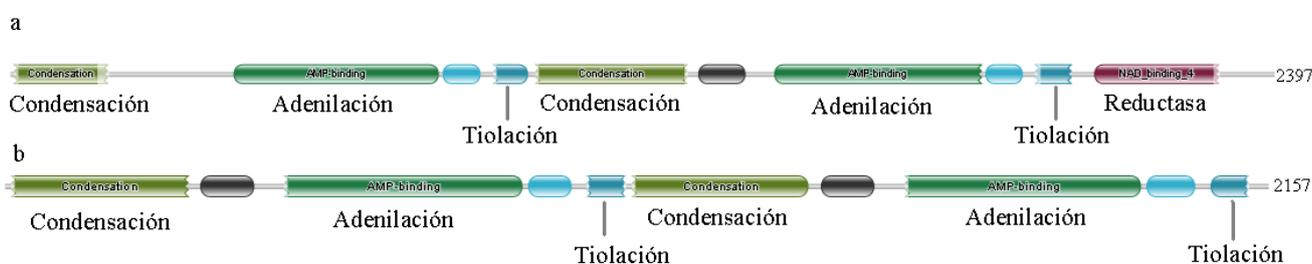


Figura 15. Ejemplos de los resultados de predicción de dominios con la herramienta HMMER. a) Predicción de dominios de AusA de *S. aureus*, b) predicción de dominios de PvdJ de *P. aeruginosa*. Se muestran los dominios más importantes para la función de las PSNR.

Tabla 6. Genes de péptido sintetasas no ribosomales de *P. aeruginosa* PAO1 seleccionados para este trabajo y mutantes en estos genes. A: adenilación, C: condensación, T: tiolación, MeT: metil-transferasa, Tio: tioesterasa.

PAORF	Descripción	Clasificación	Dominios	ID	Transposón
PA2302	AmbE, síntesis de AMB	1	A-MeT-T-C-Tio	4216	ISlacZ/hah
PA2305	AmbB, síntesis de AMB	1	C-T-A	8984 5061	ISlacZ/hah
PA2424	PvdL, síntesis de pioverdina	1	A-T-C-A-T-C-A-T- C-C-A-T	778	ISlacZ/hah
PA2400	PvdJ, síntesis de pioverdina	1	C-A-T-C-A-T	3265 2016	ISlacZ/hah
PA2402	probable péptido sintetasa no ribosomal	3	C-A-T-C-C-A-T-C- A-T-C-C-A-T	468	ISlacZ/hah
PA3327	probable péptido sintetasa no ribosomal	3	C-A-T-C-A-T-Tio	177 45465	ISlacZ/hah ISphoA/hah
PA4078	probable péptido sintetasa no ribosomal	3	A-T-NAD	42724 21095	ISphoA/hah ISlacZ/hah
PA4225	PchF, piochelina sintetasa	1	C-A-T-Tio	41376	ISphoA/hah
PA4226	PchE, ácido dihidroaeruginoso sintetasa	1	T-C-A-T	49903	ISphoA/hah

Para la búsqueda de posibles genes de ciclo-dipéptido sintetasas se utilizó como sonda la secuencia de la proteína AlbC de *Streptomyces noursei*, que codifica para una ciclo-dipéptido sintetasa de 239 aminoácidos reportada para catalizar la formación de ciclo(L-Phe-L-Leu) y ciclo(L-Leu-L-Leu) (Lautru, et al., 2002). Al hacer el análisis BLASTp (matriz BLOSUM62, tamaño de letra 3, máximo de 100 secuencias) en la página web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> de la secuencia de AlbC contra el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 nos arrojó una lista de 7 posibles genes candidatos (tabla 7) (Altschul, et al., 1997).

Tabla 7. Resultado del BLASTp de AlbC de *S. noursei* contra el genoma de *P. aeruginosa* PAO1.

ORF	Descripción	Score	E value
PA1264	Probable regulador transcripcional	26.9	1.6
PA1875	Probable precursor de proteína de membrana externa	26.2	3.0
PA0268	Probable regulador transcripcional	26.2	3.4
PA5524	Probable deshidrogenasa de cadena corta	25.8	3.5
PA4423	Proteína hipotética conservada	25.8	5.0
PA3946	Sensor de dos componentes RocS1	25.8	5.3
PA5259	hemD	24.6	9.2

Como se puede observar en la tabla 7, los parámetros de score y valor E (esperado) son bajos y altos, respectivamente. Aunque esto último se podría esperar ya que este tipo de enzimas guardan una baja similitud/identidad, pero si es importante resaltar que la probable función que se le asignó a los genes no tiene ninguna relación a la función esperada. Para determinar si estos genes son candidatos a realizar la función de ciclo-dipéptido sintasa se realizó un análisis de motivos conservados (figura 16).



Figura 16. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de ciclo-dipéptido sintasas (derecha) y el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las secuencias de ciclo-dipéptido sintasas y una de las candidatas obtenidas del análisis BLASTp (derecha). Los asteriscos (\*) indican que el residuo esta conservado entre las secuencias, dos puntos (:) indican una fuerte similitud del residuo entre las secuencias y un punto (.) indica una débil similitud del residuo entre las secuencias.

Con el alineamiento de la figura 16 se pueden observar que los residuos marcados con asteriscos, que son los conservados en las secuencias de las ciclo-dipéptido sintasas, son los residuos importantes en el centro catalítico y que realizan las interacciones entre los aminoacil-ARNt y catalizan la formación del ciclo dipéptido. Para el caso de la comparación donde se utilizó una de las candidatas obtenidas por el análisis BLASTp, se observa que esta secuencia no conserva más que solo uno de los residuos importantes para la función ciclo-dipéptido sintasa. Se realizó el mismo alineamiento con las demás candidatas de la tabla 7 con resultados similares. Por lo que en este trabajo no logramos identificar en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 a posibles genes de ciclo-dipéptido sintasas dependientes de tRNA. Por el contrario, como ya se

mencionó, si se lograron identificar CDP-sintasas del tipo modular, por lo que el trabajo prosiguió en este grupo de genes candidatos.

### **Determinación de la producción de ciclo-dipéptidos en mutantes de *P. aeruginosa*.**

Para identificar el gen o conjunto de genes que afectan la síntesis de ciclo-dipéptidos en *P. aeruginosa* PAO1, se crecieron las cepas mutantes en los genes seleccionados (tabla 6), además utilizó como control a la cepa silvestre (*P. aeruginosa* PAO1) y la doble mutante de los sistemas de producción de HSL *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup>. Del medio de cultivo de cada cepa, se hicieron extracciones líquido-líquido con acetato de etilo acidificado con ácido acético al 0.01% v/v y se analizaron por CG-EM (cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas) para observar el perfil de producción de ciclo-dipéptidos que son liberados por las células. En la figura 17 se muestra el cromatograma representativo de la cepa silvestre. Se resalta con líneas los tiempos de retención cuyo patrón de fragmentación molecular corresponde a algún ciclo-dipéptido. Entonces se obtuvieron tres tiempos de retención (11.2, 12.7 y 13.0 min), en donde el patrón de ionización indica que corresponden a ciclo(*L*-Pro-*L*-Val) (figura 17B) y en los tiempos de retención de 19.8 y 21.8 min se identificó a ciclo(*L*-Pro-*L*-Phe) y ciclo(*L*-Pro-*L*-Tyr) (figura 17C y D), respectivamente.

Para cada señal de los tiempos seleccionados (11.2, 12.7, 13.0, 19.8 y 21.8 min) fue considerada la diferencia en la concentración, que se determinó como el área bajo la curva de cada pico y cada área se normalizó en relación al área de PAO1 que representa el 100%. Esto se realizó para cada una de las cepas mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 (tabla 6) y usando como control la cepa doble mutante *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup>, que según lo reportado por Ortiz-Castro y col (2011), produce concentraciones incrementadas de los ciclo-dipéptidos (figura 18).

Para ciclo(Pro-Val)-1, 2 y 3, que aparentemente está sufriendo modificaciones sobre la molécula de ciclo(*L*-Pro-*L*-Val) y que se puede explicar por la coincidencia en el patrón de ionización, ya que se observaron cambios principalmente en el área de los picos de las mutantes, respecto a la cepa silvestre PAO1. Aunque al haber un conjunto de productos se podría deber a que la producción sea por una acumulación en alguno de los intermediarios que se producen y por esto enmascarar los cambios en la producción de los compuestos. En cuanto a CDP ciclo(*L*-Pro-*L*-Phe), observamos que las diferencias más marcadas en la acumulación de este compuesto por las cepas mutantes

en péptido sintetas no-ribosomales de los operones *amb* (*ambB*<sup>-</sup>/8984, *ambE*<sup>-</sup>), *pvd* (*pvdJ*<sup>-</sup>/2016 y 3265) y en ambas mutantes de los ORF PA3327 (177 y 45465) y PA4078 (21095 y 42724). Finalmente, para ciclo(*L*-Pro-*L*-Tyr) también se observa una tendencia a su acumulación por las diferentes mutantes seleccionadas.

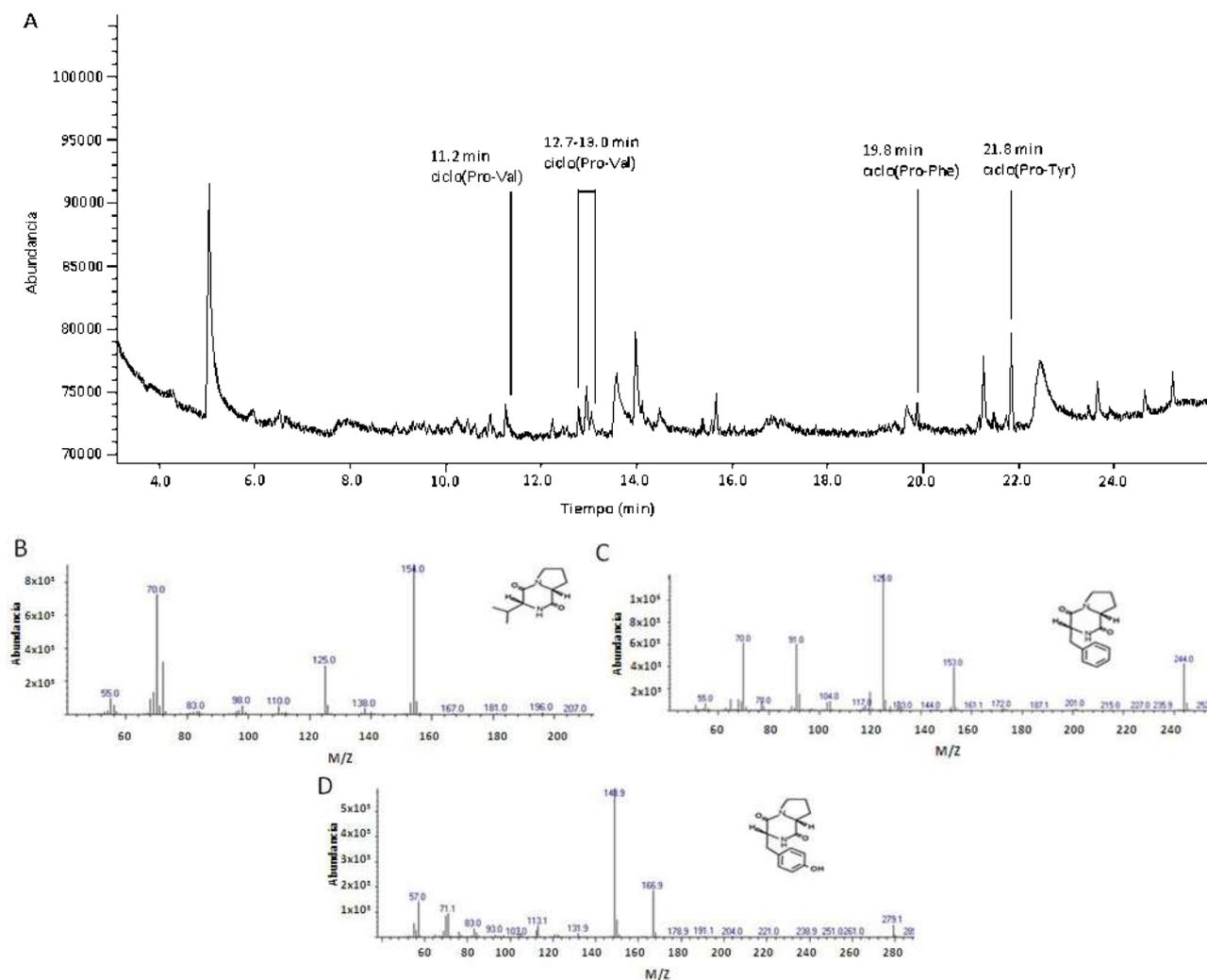


Figura 17. Análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). A) Cromatograma representativo de extracto de *P. aeruginosa* PAO1, se indican los tiempos de retención de los ciclo-dipéptidos encontrados. B) Patrón de fragmentación de ciclo(*L*-Pro-*L*-Val). C) Patrón de fragmentación de ciclo(*L*-Pro-*L*-Phe). D) Patrón de fragmentación de ciclo(*L*-Pro-*L*-Tyr).

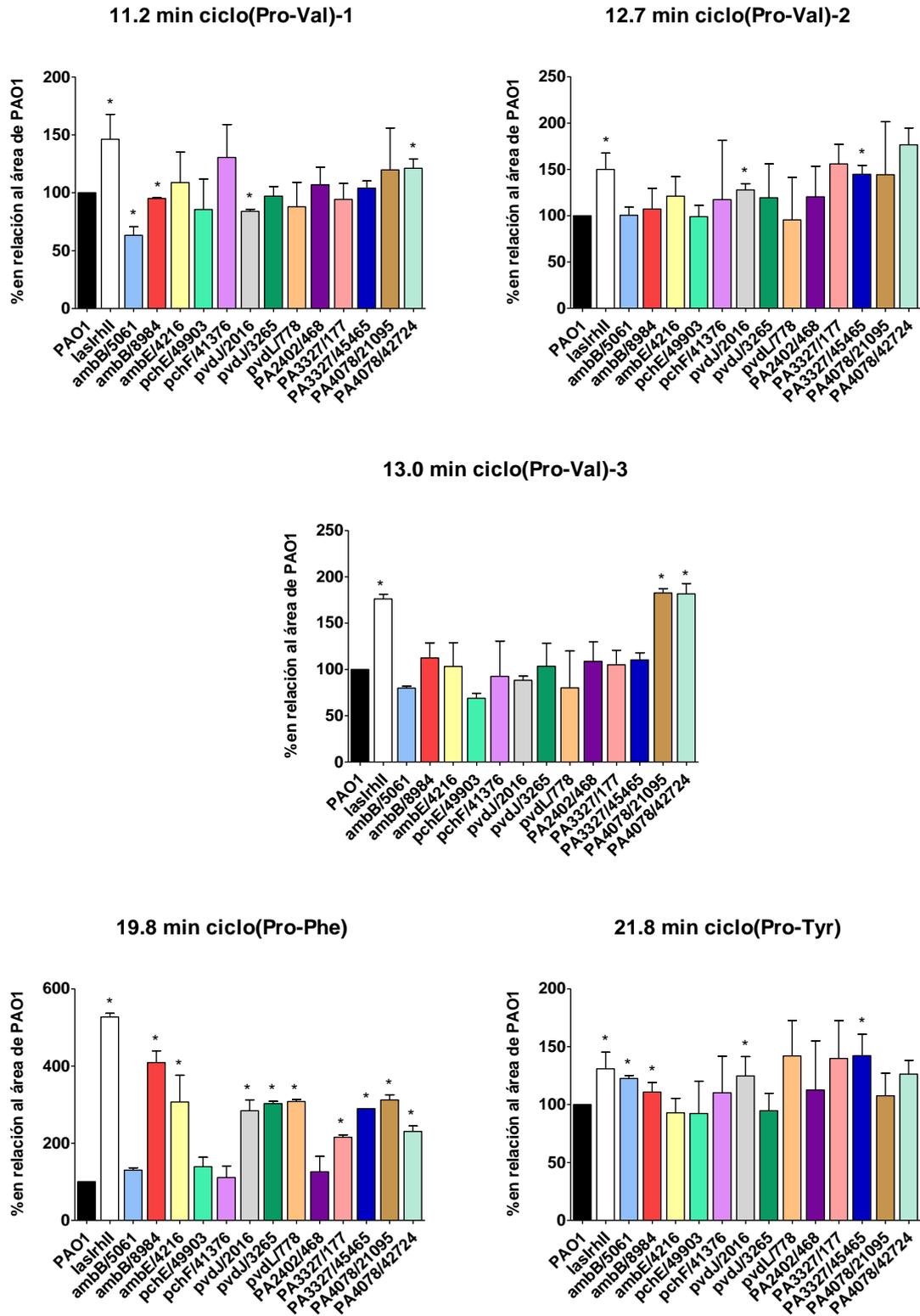


Figura 18. Área de los picos obtenidos por CG-EM, en los tiempos de retención de 11.2, 12.7, 13.0, 19.8 y 21.8 min, donde se muestra la cepa silvestre (PAO1), la doble mutante *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> y las cepas mutantes seleccionadas para este trabajo. ANOVA, Tukey, las barras indican la media y las barras de error representan desviación estándar (n=3), \*(p<0.05, vs PAO1).

## **Evaluación del efecto de las mutaciones de péptido sintasas no-ribosomal sobre el efecto promotor en plantas de *A. thaliana*.**

A los ciclo-dipéptidos producidos por *P. aeruginosa* se les ha asignado una posible función como las moléculas empleadas para la comunicación inter-especies, induciendo una promoción del crecimiento vegetal (Ortiz-Castro, et al., 2011). Debido a esto, se decidió usar el mismo modelo de interacción empleado por Ortiz-Castro y col (2011) para identificar la participación de los genes seleccionados para este trabajo en el crecimiento de la planta *Arabidopsis thaliana* (figura 19).

A partir de este modelo de co-inoculación se puede observar como los compuestos difusibles al medio de cultivo producidos por *P. aeruginosa* afectan la morfología de la raíz de *A. thaliana* (Ortíz-Castro, et al., 2009). Estos cambios fueron cuantificados a partir de la medición de la longitud de la raíz primaria, número de raíces laterales y densidad de raíces laterales (figura 20). Los datos muestran que la longitud de la raíz primaria de la planta es inhibida por la interacción con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1, caso contrario a la interacción con la doble mutante *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup>, la cual mostró que la longitud de la raíz fue similar al control sin inoculación. Para las mutantes de *P. aeruginosa* *ambB*<sup>-</sup>/8984 y *pvdJ*<sup>-</sup>/3265, se observa que estas indujeron un fenómeno similar a la doble mutante *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup>, en donde no hay un acortamiento de la raíz primaria. Mientras que las mutantes PA4078/21095 y PA3327/45465, provocaron un acortamiento de la raíz primaria similar a PAO1. En cuanto al número de raíces laterales (RL), PAO1, *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> y las mutantes seleccionadas no se observaron diferencias significativas en el número de RL inducidas en *A. thaliana*, pero todas mostraron un mayor número de raíces laterales que el control sin inoculación. Finalmente, la densidad de raíces laterales (DRL), vemos que comparado con el control sin inoculación, la cepa silvestre PAO1 indujo una mayor densidad de raíces laterales, al igual que las mutantes PA4078/21095 y PA3327/45465 mostraron efectos similares a la cepa PAO1, mientras que la doble mutante *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> indujo una menor densidad de raíces laterales. Interesantemente, las mutantes *ambB*<sup>-</sup>/8984 y *pvdJ*<sup>-</sup>/3265 mostraron un comportamiento similar a la cepa *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> en los valores de la densidad de raíces laterales.

Los resultados obtenidos con el modelo de co-inoculación de *A. thaliana* indican que los genes *ambB* y *pvdJ* de *P. aeruginosa* tienen una participación en la

comunicación bacteria-planta similar al observado en la mutante en los genes *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> de *P. aeruginosa*.

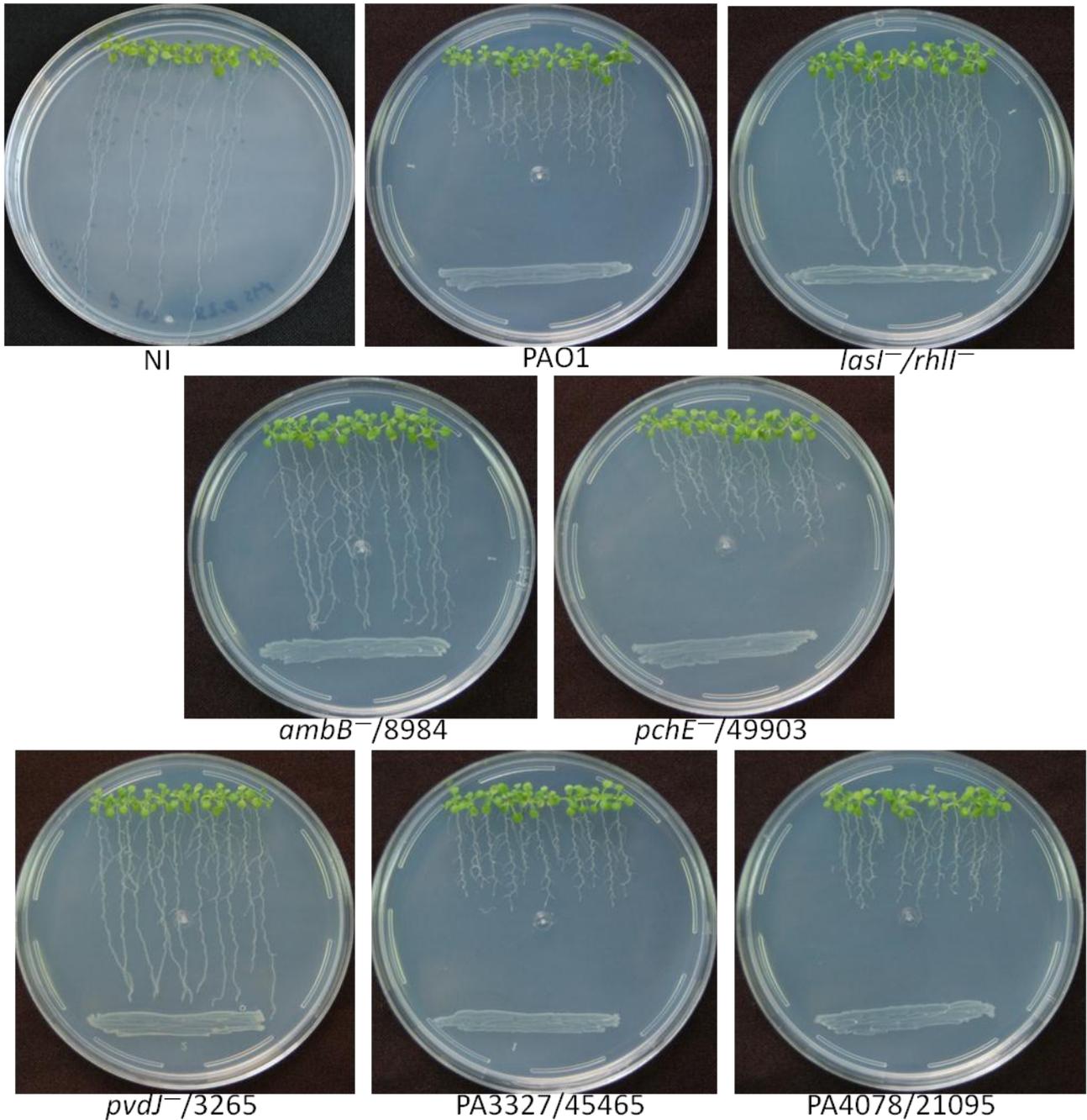


Figura 19. Fotografías representativas de la co-inoculación de las cepas silvestre y mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 y *A. thaliana* col-0. Las semillas de *A. thaliana* fueron crecidas por 4 días después a su germinación y posteriormente fueron co-inoculadas a 5 cm (aprox.) de la punta de la raíz con las cepas de *P. aeruginosa* PAO1, la doble mutante *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> y las mutantes seleccionadas para este trabajo.

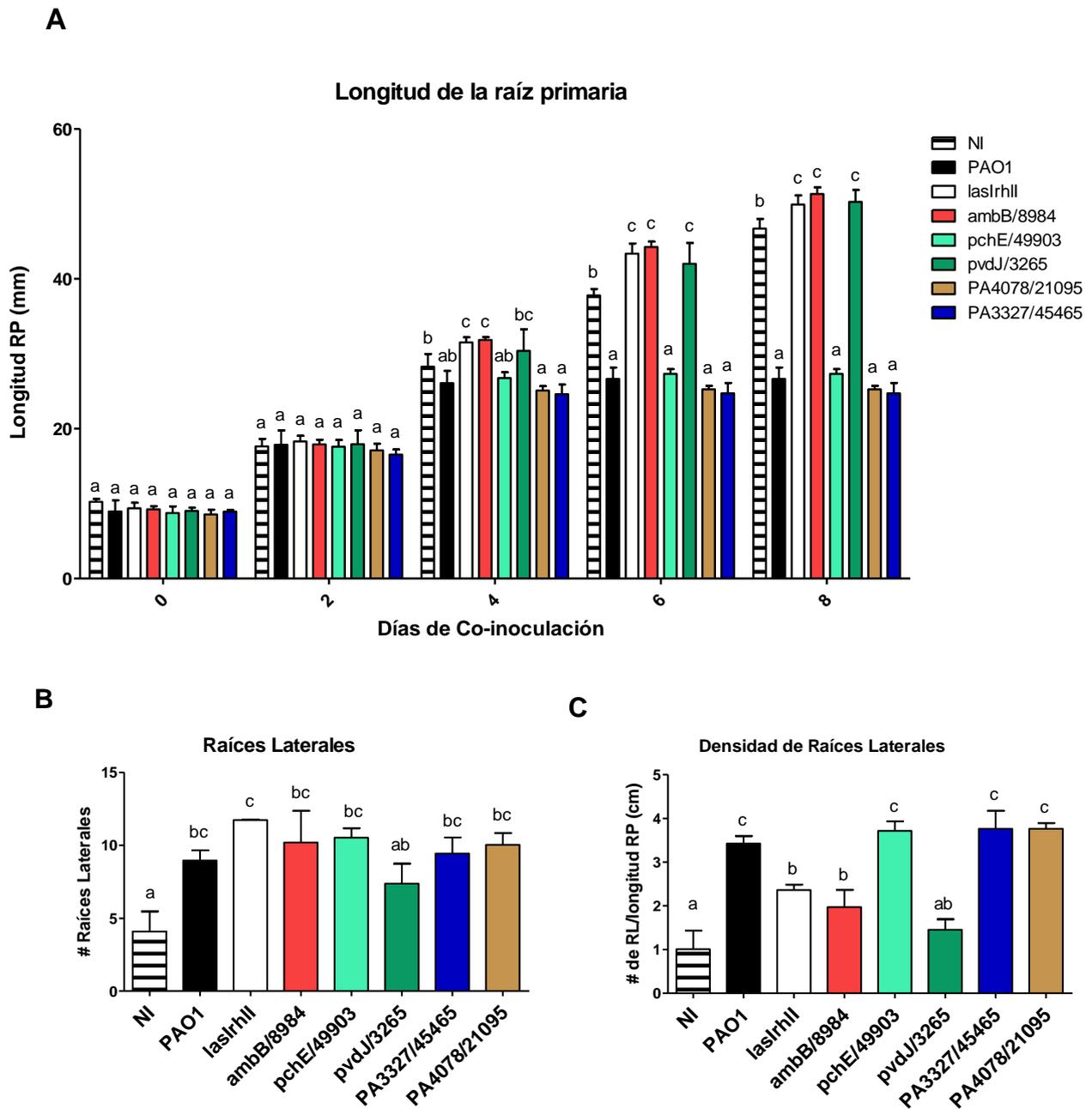


Figura 20. Datos cuantitativos de la co-inoculación de cepas de *P. aeruginosa* con plantas de *A. thaliana*. A) Cuantificación de la longitud de la raíz primaria de *A. thaliana* inducida por PAO1, *lasI*<sup>-</sup>/*rhII*<sup>-</sup> y las mutantes seleccionadas de *P. aeruginosa* PAO1. B) Cuantificación del número de raíces de *A. thaliana* inducidas por PAO1, *lasI*<sup>-</sup>/*rhII*<sup>-</sup> y las mutantes seleccionadas de *P. aeruginosa* PAO1. C) Determinación de la densidad de raíces laterales de *A. thaliana* inducidas por PAO1, *lasI*<sup>-</sup>/*rhII*<sup>-</sup> y las mutantes seleccionadas de *P. aeruginosa* PAO1. ANOVA, Tukey ( $p < 0.05$ ), las barras indican la media y las barras de error representan desviación estándar ( $n=3$ ).

**Evaluación del efecto de las mutantes en péptido sintasas no-ribosomales sobre la producción de HSL y factores de virulencia en *P. aeruginosa*.**

Las mutantes de *P. aeruginosa* *ambB*<sup>-</sup>/8984 y *pvdJ*<sup>-</sup>/3265 mostraron comportamiento similar a *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> en la promoción vegetal de *A. thaliana*, cuando se encuentran en co-inoculación. Ya que *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> no produce HSL (homoserina lactonas) se probó a las mutantes de *P. aeruginosa* con un modelo biosensor de HSL como es la inducción de violaceína en la mutante de *Chromobacterium violaceum* CV026 que al percibir HSL produce el pigmento violeta llamado violaceína (figura 21) (McClellan, et al., 1997).

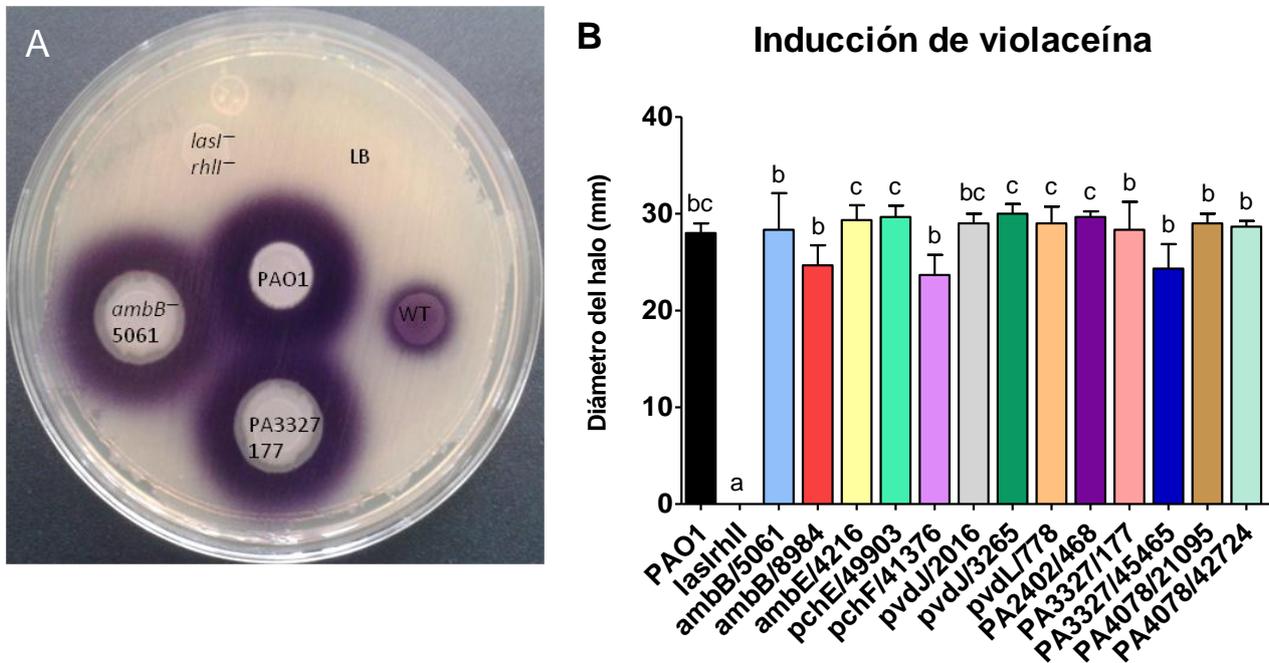


Figura 21. Inducción de violaceína de *Chromobacterium violaceum* CV026 por cepas de *P. aeruginosa*. A) Fotografía representativa de la interacción entre la mutante de *C. violaceum* CV026 y PAO1, *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> y las mutantes seleccionadas de *P. aeruginosa* PAO1. B) Datos cuantitativos de la interacción entre la mutante de *C. violaceum* CV026 y PAO1, *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> y las mutantes seleccionadas de *P. aeruginosa* PAO1. ANOVA, Tukey, las barras indican la media y las barras de error representan desviación estándar (n=3). \*(p<0.05)

Al colocar en interacción a la cepa mutante de *C. violaceum* CV026, se provocó un halo de color violeta tanto por la cepa silvestre PAO1, así como en las mutantes seleccionadas, excepto *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> que no indujo la producción de violaceína. Los resultados claramente indican que las cepas mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 en los

genes de las posibles péptido sintetasa no-ribosomal poseen la capacidad de producir HSL ya que indujeron la producción de violaceína. Estos resultados sugieren que los efectos de las mutantes observados en el ensayo de co-inoculación con *Arabidopsis* similar al de la doble mutante *lasI<sup>-</sup>/rhlI<sup>-</sup>*, éste no es asociado con la deficiencia de síntesis de HSL. Por lo que el efecto de promoción del crecimiento en la planta de *Arabidopsis* no se asocia con el quorum sensing. Entoces esa conexión se puede buscar al determinar los factores de virulencia producidos por *P. aeruginosa*, por lo que en este trabajo se determinaron los factores de virulencia elastasa y piocianina (figura 22).

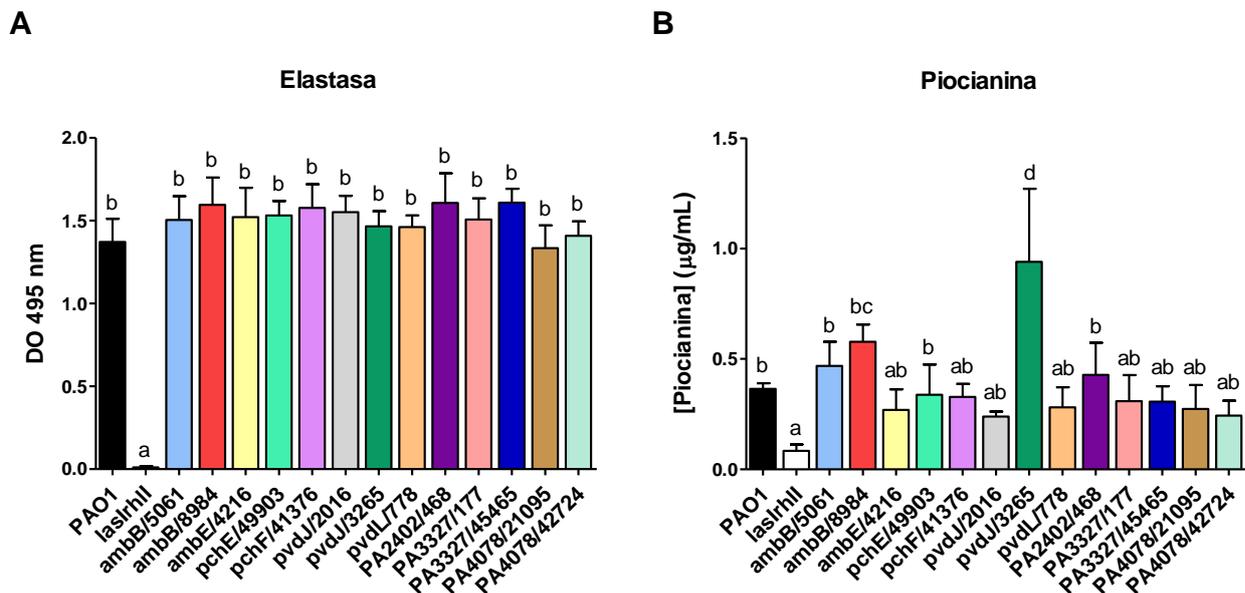


Figura 22. Determinación de factores de virulencia de cepas de *P. aeruginosa* PAO1. A) Determinación de actividad elastasa de PAO1, *lasI<sup>-</sup>/rhlI<sup>-</sup>* y las mutantes seleccionadas. B) Determinación de concentración de piocianina de PAO1, *lasI<sup>-</sup>/rhlI<sup>-</sup>* y las mutantes seleccionadas. ANOVA, Tukey ( $p < 0.05$ ), las barras indican la media y las barras de error representan desviación estándar ( $n=3$ ).

La determinación de la actividad de elastasa mide indirectamente la actividad del sistema *las* de *P. aeruginosa*, y como podemos observar en la figura 22A, no hay diferencias en la actividad de las mutantes en los genes péptido sintetasa no-ribosomal, en relación a la actividad de elastasa medida en PAO1. En cuanto a la determinación de piocianina (figura 22B), que mide indirectamente la actividad del sistema *rhl* de *P. aeruginosa*, se puede ver que solo la mutante *pvdJ<sup>-</sup>/3265* tuvo un considerable incremento de hasta 3 veces en la producción de piocianina, en comparación con la cepa silvestre. Y la mutante *ambB<sup>-</sup>/8984* mostró un ligero incremento en piocianina en

relación a la concentración de mostrada por la cepa PAO1. Para ambos factores de virulencia, como era de esperarse, los niveles de elastasa y piocinaina en la doble mutante *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> fueron prácticamente nulos. Por lo que los resultados obtenidos de la inducción de violaceína y la determinación de factores de virulencia, sugieren que los genes que codifican para las posibles péptido sintetasa no-ribosomal no son regulados a través de la señalización por quórum sensing en *P. aeruginosa*.

## VIII. DISCUSIÓN.

Se conocen dos mecanismos enzimáticos para la síntesis de ciclo-dipéptidos realizada por microorganismos. El primer mecanismo es el realizado por las péptido sintetasas no-ribosomales (PSNR), que ha sido ampliamente estudiado para la producción de péptidos no-ribosomales utilizados en la terapéutica moderna (Caboche, et al., 2008). Debido a la alta complejidad estructural que presentan tienen una gran diversidad funcional y de esta manera afectando una variedad de blancos terapéuticos. La síntesis de péptidos por este mecanismo se lleva a cabo por enzimas arregladas a manera de módulos, y cada módulo esta constituido por los dominios de adenilación, tiolación y condensación, que son los que realizan la función de unir y enlazar a los aminoácidos mediante el empleo de ATP, para la formación de los dipéptidos. Para la síntesis de los ciclo-dipéptidos se requiere de enzimas formadas de dos módulos (Huang, et al., 2008). El segundo mecanismo es específico para la formación de ciclo-dipéptidos y es realizado por las ciclo-dipéptido sintetasas (CDPS) (Belin, et al., 2012). A diferencia de las PSNR, las CDPS no requieren de ATP (necesario para la activación de los aminoácidos), usan ARNt aminoacilados, además tienen un tamaño molecular considerablemente menor (~200 residuos contra ~2000 residuos de las PSNR). Ambos mecanismos producen una variedad de productos debido a la promiscuidad de las enzimas hacia el sustrato, por lo que una misma enzima puede catalizar la síntesis de diferentes ciclo-dipéptidos con una abundancia que depende de la relativa especificidad de las enzimas hacia el sustrato (Gondry, et al., 2009; Wang, et al., 2010).

Interesantemente ambos tipos de mecanismo se han probado en organismos heterólogos y ambos sistemas funcionan adecuadamente (Gruenewald, et al., 2004; Giessen, et al., 2013). Por lo que es una interesante estrategia para la producción de ciclo-dipéptidos que han sido descritos con diversas propiedades biológicas (Martins y Carvalho, 2007).

En *Pseudomonas aeruginosa* es desconocido el mecanismo mediante el cual se sintetizan los ciclo-dipéptidos: ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Phe) y ciclo(L-Pro-L-Tyr) (Ortiz-Castro, et al., 2011). Y en este trabajo nos dimos a la tarea de realizar una búsqueda de posibles genes cuyos productos generados poseen esta función, siendo considerados ambos mecanismos descritos. Del resultado de esta búsqueda encontramos que en el genoma de *P. aeruginosa* PAO1 existen diversos genes que podrían codificar

para péptido sintetasas no-ribosomales (tabla 6). Mientras que para las ciclo-dipéptido sintetasas no se lograron encontrar candidatos de este tipo.

Una estrategia ampliamente utilizada por la comunidad científica para determinar la función de diversos genes, es la determinación por ausencia de la función. Esta función puede truncarse por diferentes metodologías, entre las más usadas esta el empleo de mutaciones por transposición, donde se inserta un fragmento de ADN externo a la secuencia de un gen. Lo que cambia el entorno genético de tal forma que se impide la expresión del gene interrumpido. Además se cuenta con la ventaja de estar disponible un banco de mutantes por transposición de prácticamente todo el genoma de *P. aeruginosa* (Jacobs, et al., 2003). Por lo que se seleccionaron mutantes correspondientes a los probables genes que codifican a las péptido sintetasas modulares (tabla 6).

Usando las mutantes en posibles péptido sintetasas no-ribosomales de *P. aeruginosa* PAO1 se realizaron extracciones líquido-líquido con acetato de etilo del medio de cultivo del crecimiento de cada cepa, libre de células y se analizaron por CG-EM en busca de modificaciones en el perfil de producción de ciclo-dipéptidos (figura 18). Utilizando esta metodología logramos la identificación de los ciclo-dipéptidos anteriormente identificados [ciclo(*L-Pro-L-Val*), ciclo(*L-Pro-L-Phe*) y ciclo(*L-Pro-L-Tyr*)], pero además observamos que existen tres compuestos con tiempo de retención diferente (11.2, 12.7 y 13.0 min), cuyo patrón de fragmentación molecular corresponde al ciclo(*L-Pro-L-Val*) (figura 17). Como no se logró dilucidar la naturaleza de estos CDPs, los nombramos como ciclo(*Pro-Val*)-1, ciclo(*Pro-Val*)-2 y ciclo(*Pro-Val*)-3 debido a que corresponden a compuestos diferentes ya que están eluyendo a tiempos diferentes en la separación cromatográfica, pero conservan la estructura básica del mismo ciclo-dipéptido.

Para el ciclo(*L-Pro-L-Phe*) y ciclo(*L-Pro-L-Tyr*), éstos se identificaron en los tiempos de retención de 19.8 y 21.8 min, respectivamente, de igual manera corroborados por el patrón de fragmentación molecular descrito previamente (figura 17). En cuanto a las modificaciones en la producción de los ciclo-dipéptidos, para los ciclo(*Pro-Val*)-1, -2 y -3 se observaron variaciones en la producción por la diferentes mutantes, aunque podríamos desestimar estas variaciones debido a que pueden ser atribuidas a las modificaciones que se pueden presentar sobre la estructura de la

molécula del ciclo-dipéptido (ciclo(*L-Pro-L-Val*)) y que al parecer las mutaciones no están afectando a un producto determinado. Aunque interesantemente, para los tres productos las mutantes en el ORF PA4078 (21095 y 42724) se observó un incremento en la acumulación de estos CDPs, comparada con la cepa silvestre.

En el caso del CDP ciclo(*L-Pro-L-Phe*) este fue el producto donde se observaron las mayores afectaciones sobre su producción, siendo las mutaciones en los genes de los operones *amb* (*ambB*<sup>-</sup>/8984, *ambE*<sup>-</sup>), *pvd* (*pvdJ*<sup>-</sup>/2016 y 3265) y en ambas mutantes de los ORF PA3327 (177 y 45465) y PA4078 (21095 y 42724), las que mostraron una acumulación significativa del CDP ciclo(*L-Pro-L-Phe*) comparada con la cepa PAO1. Finalmente, en las mutantes en el gen *ambB* (5061 y 8984), *pvdJ*/2016 y PA3327/45465 muestran un incremento en la acumulación de CDP ciclo(*L-Pro-L-Tyr*). Debido a estos resultados, donde observamos principalmente incremento en la producción, comparado con la cepa silvestre, y enfocándonos en los resultados del ciclo(*L-Pro-L-Phe*) podemos generar tres posibilidades que explicarían este fenómeno: 1) Las mutaciones en los genes péptido sintetasa seleccionados están cumpliendo una función redundante en cuanto a catalizar la síntesis de los ciclo-dipéptidos producidos por *P. aeruginosa*, y al mutar alguno de estos genes (los genes de los operones *amb* (*ambB*<sup>-</sup>/8984, *ambE*<sup>-</sup>), *pvd* (*pvdJ*<sup>-</sup>/2016 y 3265) y en ambas mutantes de los ORF PA3327 (177 y 45465) y PA4078 (21095 y 42724) se presenta una desregulación debida a la descompensación en el flujo metabólico, por lo que se presenta una mayor actividad y por tanto un incremento del producto. 2) Que las mutaciones no estén afectando a enzimas involucradas en la síntesis de ciclo-dipéptidos, sino que corresponda a genes cuya función sea relacionada a la síntesis de péptidos de funciones desconocidas y que por consecuencia al mutarse exista una mayor disponibilidad de sustratos (aminoácidos), y por lo tanto al tener mayor cantidad de sustrato exista una mayor cantidad de productos no relacionados (CDPs). 3) Las mutaciones estén afectando a un gen cuya función este relacionada con modulación de las concentraciones de ciclo-dipéptidos (hidrólisis) y debido a esta afectación exista una acumulación en el medio.

Después de observar que los cambios en la síntesis de los ciclo-dipéptidos producidos por *P. aeruginosa*, fue relevante determinar si de alguna manera existía una modificación en la estimulación del crecimiento vegetal inducido en un modelo de co-inoculación de plantas de *Arabidopsis thaliana* (figura 19) (Ortíz-Castro, et al., 2009). Para propósitos prácticos solo se mostraron los resultados de la co-inoculación de las

mutantes: *ambB*<sup>-</sup>/8984, *pchE*<sup>-</sup>/49903, *pvdJ*<sup>-</sup>/3265, PA3327/45465 y PA4078/21095. Las variables que se cuantificaron fueron: la longitud de la raíz primaria, número de raíces laterales y densidad de raíces laterales (figura 20). Donde observamos que la longitud de la raíz primaria de la planta es inhibida por la interacción con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1, caso contrario a la interacción con la doble mutante *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> cuya longitud de la raíz primaria fue similar al control sin inoculación. Para las mutantes de *P. aeruginosa* PAO1, las mutantes *ambB*<sup>-</sup>/8984 y *pvdJ*<sup>-</sup>/3265, indujeron un fenómeno similar a *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup>, en donde no hay un acortamiento de la raíz primaria. Mientras que las mutantes PA4078/21095 y PA3327/45465, provocaron un acortamiento de la raíz similar a PAO1. En cuanto al número de raíces laterales, PAO1, *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> y las mutantes seleccionadas no mostraron diferencias en el número de raíces que indujeron en *A. thaliana*, pero todas mostraron un mayor número de raíces laterales que el control sin inoculación. Finalmente, la densidad de raíces laterales en las mutantes PA4078/21095 y PA3327/45465 fueron similares a la cepa PAO1, mientras que la doble mutante *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> indujo en menor proporción la densidad de raíces laterales, comparado con la cepa PAO1, pero esto se ve influenciado por la mayor longitud de la raíz de la planta en interacción con *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup>. Las mutantes *ambB*<sup>-</sup>/8984 y *pvdJ*<sup>-</sup>/3265 mostraron un comportamiento similar a *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> en la inducción medida por la densidad de raíces laterales. Los resultados muestran que aunque las mutaciones en los genes péptido sintetasa no-ribosomales seleccionadas están generando una mayor producción de los ciclo-dipéptidos, solamente las mutaciones en los genes *ambB* y *pvdJ* están provocando un fenómeno similar a la mutación en los genes *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> de *P. aeruginosa* (Ortiz-Castro, et al., 2011).

Debido a que la doble mutante *lasI*<sup>-</sup>/*rhlI*<sup>-</sup> en los sistemas de quórum sensing no produce *N*-acil-*L*-homoserina lactonas (HSL) ni factores de virulencia (Pesci, et al., 1997), se decidió determinar si las cepas mutantes en las posibles péptido sintetasa no-ribosomales seleccionadas están afectadas en cuanto a la producción de estas moléculas, que se conoce afectan la longitud de la raíz de *A. thaliana*. Para la determinación de HSL se utilizó una cepa mutante de *Chromobacterium violaceum* CV026, que se utiliza como biosensor de HSL. *C. violaceum* produce de manera natural el pigmento violaceína, cuya producción esta regulada por quórum sensing. Y la mutante *C. violaceum* CV026 esta afectada en la síntesis de HSL, por lo que no produce violaceína, pero es capaz de percibir HSL producidas por el microorganismo con el que

interacciona (McClean, et al., 1997). Entonces se colocó en interacción con las mutantes seleccionadas de *P. aeruginosa* PAO1 y mediante la medición de la inducción de un halo violeta (figura 21), se determinó que no existen diferencias en la producción de HSL por las mutantes en los genes péptido sintetasa no-ribosomal seleccionadas de *P. aeruginosa* PAO1. Por lo que se procedió a determinar la producción de los factores de virulencia, elastasa y piocianina.

La elastasa es una proteasa liberada por *P. aeruginosa* que sirve como un indicador indirecto de la actividad del sistema *las* relacionado con el quórum sensing (Juhas, et al., 2005). La actividad de elastasa en las mutantes seleccionadas de *P. aeruginosa* PAO1 se determinó al colocar el medio de cultivo de las cepas bacterianas en reacción con la elastina enlazada al colorante rojo Congo, por lo que al presentarse la actividad de elastasa se libera el colorante y este fue medido espectrofotométricamente (figura 22). Los resultados indican que tampoco existen diferencias en la actividad de elastasa por las mutantes en los genes péptido sintetasa no-ribosomal seleccionadas de *P. aeruginosa* en comparación con la cepa silvestre PAO1.

Finalmente se determinó la piocianina producida por las mutantes seleccionadas de *P. aeruginosa*. La cuantificación de piocianina funciona como un indicador indirecto de la actividad del sistema *rhl* relacionado también con el quórum sensing (Juhas, et al., 2005). Por lo que se cuantificó la piocianina a partir del medio de cultivo de las cepas. En este caso se observó que la mutante *pvdJ*<sup>-</sup>/3265 tuvo un gran incremento de hasta 3 veces en la producción de piocianina, en relación a la cepa silvestre. Y la mutante *ambB*<sup>-</sup>/8984 mostró una tendencia incrementada, en relación a la concentración de PAO1. Los resultados referentes a la inducción de violaceína y la determinación de factores de virulencia, nos permiten descartar que los genes seleccionados como posibles péptido sintetasa no-ribosomales sean regulados a través de la señalización por quórum sensing en *P. aeruginosa*.

Al relacionar los resultados de la producción de HSL y factores de virulencia, donde vemos que estos compuestos no están siendo afectados por las mutaciones en los genes seleccionados de péptido sintetasa no-ribosomales (para *pvdJ*<sup>-</sup>/3265 y *ambB*<sup>-</sup>/8984 incluso esta incrementada la concentración de piocianina) y al observar el efecto sobre la raíz primaria de la planta podemos decir que en la co-inoculación con *A. thaliana* es muy interesante que estos compuestos no están induciendo una inhibición de

la raíz primaria de las plantas, contrario a lo reportado (Ortiz-Castro, et al., 2011). Por lo que aún se desconoce el fenómeno que está sucediendo durante la interacción planta-microorganismo.

## **IX. CONCLUSIÓN.**

En *Pseudomonas aeruginosa* las mutaciones en los genes *ambB* y *pvdJ* modificaron de manera positiva la producción de ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Phe) y ciclo(L-Pro-L-Tyr), causando un efecto de promoción del crecimiento vegetal en *Arabidopsis thaliana* de una manera independiente de quórum sensing.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Ankenbauer R., Hanne L. F. y Cox C. D. 1986. Mapping of mutations in *Pseudomonas aeruginosa* defective in pyoverdinin production. *J Bacteriol.* 167(1): 7-11.
- Atkinson S. y Williams P. 2009. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface.* 6(40): 959-978.
- Balasubramanian D., Schneper L., Kumari H. y Mathee K. 2013. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res.* 41(1): 1-20.
- Belin P., Moutiez M., Lautru S., Seguin J., Pernodet J. L. y Gondry M. 2012. The nonribosomal synthesis of diketopiperazines in tRNA-dependent cyclodipeptide synthase pathways. *Nat Prod Rep.* 29(9): 961-979.
- Bonnefond L., Arai T., Sakaguchi Y., Suzuki T., Ishitani R. y 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.
- Caboche S., Pupin M., Leclere V., Fontaine A., Jacques P. y Kucherov G. 2008. NORINE: a database of nonribosomal peptides. *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue): D326-331.
- Cornelis P. y Dingemans J. 2013. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol.* 3: 75.
- de Kievit, T. R. y Iglewski B. H. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun.* 68(9): 4839-4849.
- Dessaux Y., Chapelle E. y Faure D. 2011. Quorum Sensing and Quorum Quenching in Soil Ecosystems. *Biocommunication in Soil Microorganisms.* 23: 339-367.
- Feinbaum R., Urbach, J. M., Liberati N. T., Djonovic S., Adonizio A., Carvunis, A. R. y Ausubel F. M. 2012. Genome-wide identification of *Pseudomonas aeruginosa* virulence-related genes using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *PLoS Pathog.* 8(7): e1002813.

- Gondry M., Sauguet L., Belin P., Thai R., Amouroux R. y Tellier, C. 2009. Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA-dependent peptide bond-forming enzymes. *Nat Chem Biol.* 5(6): 414-420.
- Gonzalez J. E. y Keshavan N. D. 2006. Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70(4): 859-875.
- Grunewald J. y Marahiel M. A. 2006. Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70(1): 121-146.
- Huang Z.-Z., Leman L. J. y Ghadiri, M. R. 2008. Biomimetic Catalysis of Diketopiperazine and Dipeptide Syntheses. *Angew Chem Int Ed Engl.* 47(9): 1758–1761.
- Huang J. J., Han J. I., Zhang L. H. y Leadbetter, J. R. 2003. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil *pseudomonad* and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol.* 69(10): 5941-5949.
- Hur, G. H., Vickery C. R. y Burkart M. D. 2012. Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Nat Prod Rep.* 29(10): 1074-1098.
- Jacobs, M. A., 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 M. V. y Manoil C. 2003. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(24): 14339-14344.
- Jayaseelan S., Ramaswamy D. y Dharmaraj S. 2013. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol.*
- Juhas M., Eberl L. y Tummeler B. 2005. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol.* 7(4): 459-471.
- Karatuna O. y Yagci A. 2010. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clin Microbiol Infect.* 16(12): 1770-1775.
- Latifi A., Foglino M., Tanaka K., Williams P. y Lazdunski A. 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators

LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol.* 21(6): 1137-46.

Lautru S., Gondry M., Genet R. y Pernodet J. L. 2002. The albonoursin gene Cluster of *S. noursei* biosynthesis of diketopiperazine metabolites independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol.* 9(12): 1355-1364.

Mavrodi D. V., Ksenzenko V. N., Bonsall R. F., Cook R. J., Boronin A. M. y Thomashow L. S. 1998. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *J Bacteriol.* 180(9): 2541-2548.

McClellan K. H., Winson M. K., Fish L., Taylor A., Chhabra S. R., Camara M., Daykin M., Lamb J. H., Swift S., Bycroft B. W., Stewart S. A. B. y Williams P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. *Microbiology.* 143: 3703-3711.

Merino L. A. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: a bacterium with multiple personalities. *Rev Argent Microbiol.* 39(3): 143.

Meyer J. M., Neely A., Stintzi A., Georges C. y Holder, I. A. 1996. Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 64(2): 518-523.

Moutiez M., Seguin J., Fonvielle M., Belin P., Jacques I. B. y Favry E. 2014. Specificity determinants for the two tRNA substrates of the cyclodipeptide synthase AlbC from *Streptomyces noursei*. *Nucleic Acids Res.*

Ng, W. L. y Bassler B. L. 2009. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet.* 43: 197-222.

Noel S., Hoegy F., Rivault F., Rognan D., Schalk I. J. y Mislin G. L. 2014. Synthesis and biological properties of thiazole-analogues of pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg Med Chem Lett.* 24(1): 132-135.

Ortiz-Castro R., Diaz-Perez C., Martinez-Trujillo M., del Rio R. E., Campos-Garcia J. y Lopez-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.

- Ortíz-Castro R., Contreras-Cornejo H. A., Macías-Rodríguez L. y López-Bucio J. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*. 4(8): 701-712.
- Pesci E. C., Pearson J. P., Seed P. C. y Iglewski B. H. 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 179(10): 3127-3132.
- Plotnikova J. M., Rahme L. G. y Ausubel F. M. 2000. Pathogenesis of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 124(4): 1766-1774.
- Prasad C. 1995. Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides*, 16(1): 151-164.
- Schuster M. y Greenberg E. P. 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol*. 296(2-3): 73-81.
- Schuster M., Lostroh C. P., Ogi T. y Greenberg E. P. 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol*. 185(7): 2066-2079.
- Stover C. K., Pham X. Q., Erwin A. L., Mizoguchi S. D., Warrenner P., Hickey M. J., Brinkman F. S., Hufnagle W. O., Kowalik D. J., Lagrou M., Garber R. L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L. L., Coulter S. N., Folger K. R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G. K., Wu Z., Paulsen I. T., Reizer J., Saier M. H., Hancock R. E., Lory S. y Olson M. V. 2002. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406(6799): 959-964.
- Strieker, M., Tanovic, A. y Marahiel, M. A. 2010. Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr Opin Struct Biol*. 20(2): 234-240.
- Watanabe, K., Toh, Y., Suto, K., Shimizu, Y., Oka, N. y Wada, T. 2007. Protein-based peptide-bond formation by aminoacyl-tRNA protein transferase. *Nature*. 449(7164): 867-871.
- Wyatt, M. A., Mok, M. C., Junop, M. y Magarvey, N. A. 2012. Heterologous expression and structural characterisation of a pyrazinone natural product assembly line. *Chembiochem*. 13(16): 2408-2415.